

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP99/5542

PRIORITY DOCUMENT
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
 COMPLIANCE WITH
 RULE 17.1(a) OR (b)



RECD 05 OCT 1999

EPO

E3U

Bescheinigung

Die Carl Zeiss Jena GmbH in Jena/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Transportsystem zum Handling von Mikrotiterplatten"

am 4. August 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol G 01 N 35/02 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

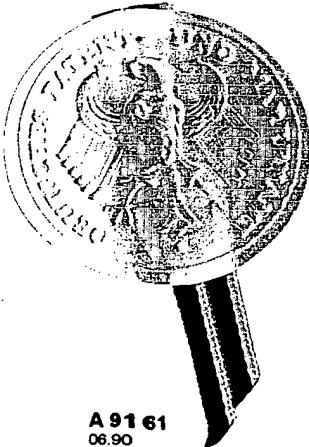
München, den 26. August 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 198 35 071.6



A 91 61
 06.90
 11/98

(EPO DWA)

Dzierzon

M 04.09.99

Stand der Technik:

Literatur:

- 1: Accelerating Drug Discovery Process with Automation and Robotics in HighThroughput Screening Editor: John P. Delvin. 1997 Marcel Dekker, Inc ISBN 0-8247-0067-8
- 2: Beispiele finden sich in Laboratory Automation News Editor Robin A. Felder Health Sciences Center Charlottesville VA 22908
- 3: Microplate Standardization Report 3 in Journal of Biomolecular Screening Vol1 N4, 1996
- 4: Spektrum der Wissenschaft Spezial Nr. 6: Pharmaforschung 1997 Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg, ISSN 0943-7096...
- 5 Industrieroboter E. J. Kreuzer, J., B., Lugtenburg, H., G., Meißner, A. Truckenbrodt 1994 Springer Verlag ISBN 3-540-54630-8

Begriffe:

HTS High Throughput Screening
MTP Mikrotiterplatte
SPS Speicherprogrammierbare Steuerung

Die Analyse von einer Vielzahl von Proben ist eine Aufgabenstellung, die sich sowohl in der pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung als auch in der medizinischen Diagnostik findet:

In der pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung ist die Entwicklung eines neuen Wirkstoffes ein Prozeß der sich über mehrere Jahre erstreckt und Kosten in Größenordnungen von mehreren hundert Millionen DM verursacht. Ausgangspunkt ist eine Zielstruktur (Target) für die ein geeigneter pharmakogener Stoff gesucht wird. [4]. Mit Hilfe einer geeigneten biochemischen Nachweisreaktion (Assay) lassen sich Reaktionen zwischen Targets und geeigneten Bindungspartnern quantitativ nachweisen. In der Pharmazeutischen Industrie existieren derzeit Bibliotheken von Wirkstoffen

mit einem Umfang von 300000 bis zu 1000000 verschiedenen Reinsubstanzen. Mit jedem neuen Target stellt sich die Aufgabe aus dieser Substanzmenge mittels eines geeigneten Assays Bindungspartner zu identifizieren. Man bezeichnet diesen Prozeß als High Throughput Screening (abgekürzt HTS = "Suchen mit großem Probendurchsatz"). Das Ergebnis eines solchen Screenings ist eine kleine Anzahl von Substanzen (typischerweise 0.5%-1% der Gesamtzahl) die eine positive Reaktion im Assay zeigen. Diese Leitstrukturen stellen die Grundlage für die weitere Entwicklung eines Medikaments dar.

In der medizinischen Diagnostik ergeben sich die gleichen Aufgabenstellungen, der Analyse von vielen Einzelproben. (hier meist Patientenproben aus Blut, Urin, etc.) mit einer standardisierten Nachweisreaktion zum Nachweis von Infektionen, Erkrankungen, genetischen Dispositionen. Ein Beispiel ist das Screenen von Spenderblut in Blutbanken nach Infektionen. Oder Routineuntersuchungen bei Risikogruppen auf Infektionen oder andere Krankheitssymptome.

Eine Weiteres Anwendungsfeld im biochemischen Umfeld ist die kombinatorische Chemie. Hier werden durch -Parallelsynthese mehrere hundert verschiedenen Einzelsubstanzen gleichzeitig erzeugt, die im folgenden mittels geeigneter Techniken wieder bearbeitet und charakterisiert werden müssen

Zur parallelen Bearbeitung großen Probenmengen hat sich ein Probenträgerstandard entwickelt: Mikrotiterplatten (abgekürzt MTP) mit standardisierten Abmessungen und Lochraster für 96, 384, 1536. [3] Diese Anordnung erlaubt die parallele Bearbeitung von vielen Einzelproben. Die Analyse solcher MTP erfolgt durch automatisierte Abarbeitung eines Assayprotokolls. Ein solches Protokoll umfaßt eine festgelegte Anzahl von Bearbeitungsschritten: dazu gehört z.B das Lösen und Mischen von Substanzen, inkubieren für eine festgesetzte Zeit sowie die Bestimmung von Meßwerten mittels eines geeigneten Analysengerätes. Zu diesem Zweck gibt es automatisierte Probenverarbeitungsgeräte [2] zum Lösen von Feststoffen, pipettieren, mischen, inkubieren, messen.

Typische HTS Systeme sind Laborgeräte die durch ein zentrales Handlingsystem miteinander verbunden sind. Ein solches Handlingsystem

besteht aus einem Roboter mit Greifer für MTP, der entweder in einer Kreisbewegung (Dreh-Schub Arm) oder auf einer linearen Schiene die Platten zwischen den einzelnen Stationen bewegt.

Die Abarbeitung der einzelnen Arbeitsschritte wird über eine Softwaresteuerung geregelt (Scheduler) Diese optimiert die Abfolge der Prozeßschritte hinsichtlich bestehender Randbedingungen (z.B. Platte darf nur an eine freie Position übergeben werden, feste zeitliche Intervalle zwischen aufeinanderfolgenden Prozeßschritten müssen eingehalten werden, etc.)

Die Leistungsfähigkeit solcher Handlingsysteme wird im Betrieb durch die folgenden Randbedingungen eingeschränkt:

Der Roboterarm steht in den meisten Fällen nicht an der Position an der die nächste Operation erfolgt. Die Zeit um dorthin zu gelangen hängt von der letzten ausgeführten Operation ab (ist somit nicht immer gleich)

Ein Roboterarm braucht 3 Bewegungen um 2 Platten je eine Position weiter zu befördern

Die oben genannten Beschränkungen müssen von der Software, die das Gesamtsystem steuert berücksichtigt werden.

Die lineare Verknüpfung der Prozeßschritte führt dazu, daß die Randbedingung fester Zeitintervalle zwischen zwei Bearbeitungsschritten für alle Bearbeitungsschritte eingehalten werden muß

Beim Rundtakter ist die Zahl und Größe der am Prozeß beteiligten Komponenten begrenzt, dafür sind die Wege kurz

Bei der linearen Schiene werden mit zunehmender Länge die Totzeiten in denen der Arm zur nächsten Position sich bewegt immer größer.

Die Steuerung eines solchen Systems wird von einem sogenannten Scheduler koordiniert. Darunter versteht man ein Programm, das die zeitliche Abfolge der Steuerungskommandos berechnet das jede MTP die gleich Behandlung (Prozessschritte und Prozeßdauer erfährt). Es gibt zwei unterschiedliche Arten von Schedulern:

Statische Scheduler. Hier wird die zeitliche Abfolge der Steuerungskommandos vor Prozeßbeginn berechnet und im Lauf nicht mehr modifiziert.

Dynamische Scheduler: Hier wird die zeitliche Abfolge der Steuerungskommandos vor Prozeßbeginn berechnet. Im Lauf wird bei Abweichungen eine Neuberechnung vorgenommen. Dynamische Scheduler können auf Veränderungen die sich durch kleine Störungen oder Schwankungen im Prozeß ergeben reagieren, mitunter auf Kosten der Gleichbehandlung aller Platten. Beide Typen von Schedulern haben z.T. sehr komplexe Optimierungen zu vollziehen, die sich aus den oben genannten Randbedingungen der Transportsysteme, wie sie derzeit in HTS eingesetzt werden ergeben

Aufgabe der Erfindung ist ein Transportsystem, das die genannten Einschränkungen überwindet.

Der lineare Prozessablauf wird in Teilschritte untergliedert. Diese Teilschritte werden in autonomen Bearbeitungseinheiten (Modulen), die jeweils ein eigenständiges Transportsystem besitzen, bearbeitet.

Alle Bearbeitungsschritte eines Prozesses die eine festen zeitliche Beziehung zwischen aufeinanderfolgenden Bearbeitungsschritten erfordern (z.B. die genaue Einhaltung einer Inkubationszeit) sind auf einen solchen Modul zusammengefaßt.

Der Transport zwischen Bearbeitungsplätzen innerhalb eines Modules erfolgt synchron die Reihenfolge der Bearbeitungen (die sich durch den jeweiligen Prozessablauf ergibt) ist frei definierbar.

Jedes Modul besitzt einen Puffer für eingehende und ausgehende Platten.

Alle Module haben eine gemeinsame standardisierte Schnittstelle

Der Transport zwischen den Modulen erfolgt asynchron mit einem separaten Transportsystem zwischen Ausgangs- und Eingangspuffer aufeinanderfolgender Module. Die Reihenfolge des Plattentransportes ist frei definierbar.

Die Steuerung eines Moduls erfolgt über eine lokalen Steuereinheit.

Die einzelnen Modul Steuerungen sind über ein standardisiertes Netzwerk (Ethernet, Feldbus, oder künftige Weiterentwicklungen) mit entsprechendem Protokoll (TCP/IP, CAN, oder künftige Weiterentwicklungen) miteinander

MOB-00-00

verbunden. Ein Leitrechner übernimmt die Kontrolle über das gesamte System (Client Server Architektur).

Das Transportsystem zwischen den Modulen könnte realisiert werden mit:
einem linearen Transportsystem mit Greifer
einem Dreh-Schub Arm mit Greifer und entsprechender Anordnung der **Module [5]**

einem Förderband mit Stopfern und Ein- Ausschleusungen für die Platten an den Modulen

Das Transportsystem innerhalb der Module könnte realisiert werden mit:
einem Förderband mit Transfersystemen, zu den einzelnen Komponenten auf dem Modul. Für den Transfer ergeben sich folgende Möglichkeiten:
- mittels Greifern als "pick and place" Operationen,
- durch Stopper auf dem Band in Verbindung mit Ein- und Ausschiebern zwischen Transportsystem und den einzelnen Komponenten.

Drehtellern mit je 2 Aufnahmen für MTPs zwischen denen die Platten bewegt werden .

einem Knickarmroboter [5], in dessen Reichweite die einzelnen Komponenten sich befinden.

Die Steuerung eines Moduls könnte realisiert werden mit:

Speicherprogrammierbarer Steuerung (SPS) wie z.B. Siemens S5

Industrie PC mit Steckplätzen

Mikrocontroller mit Peripheribausteinen (PLC=Programmable Logic Controller)

Die Steuerung des Gesamtsystems könnte realisiert werden mit:

Speicherprogrammierbarer Steuerung (SPS) wie z.B. Siemens S5

Industrie PC mit Steckplätzen

Ein Ausführungsbeispiel für die Steuerung wäre die Anordnung von Modulsteuerungen und dem Leitrechner in einer Client Server Architektur. Die Steuerungseinheiten bestehen aus PC-Computern, die untereinander durch

11.04.01.99

Ethernet verbunden sind. Als Betriebssystem wird z.B. Windows NT verwendet, die Kommunikation via Ethernet wird mittels TCP/IP realisiert. Dies ist in Fig.1 dargestellt.

Jedes Modul M weist einen Lokalrechner PC auf, wobei alle Lokalrechner der Module dieselbe Schnittstelle aufweisen und über diese mit dem Leitrechner LR verbunden sind.. Die innerhalb des Moduls unterschiedene Hardware wird über den Lokalrechner PC gesteuert, wobei der Leitsteuererechner LR über die einheitlichen Schnittstellen Zugriff auf die jeweils im Modul betriebene Hardware hat und diese über eine Ansteuereinheit AE ansteuert.

Vorteile der oben genannten Realisierung

Die zeitkritischen Prozessschritte sind in Module gekapselt, die über Pufferplatten empfangen und weitergeben. Die Puffer erlauben es daß bei der Steuerung des Plattenflusses nicht alle Prozessschritte synchronisiert werden müssen, sondern nur die Prozesse die innerhalb eines Moduls stattfinden.

Die Module sind autonome Funktionseinheiten, die Teilschritte eines Prozesses bearbeiten können. Sie können alleine ohne das Gesamtsystem mit einer geeigneten Steuerung betrieben werden. Im Alleinbetrieb erfolgt die Zu- und Abführung der Platten entweder über die Pufferplätze, oder mit zusätzlichen Plattenspeichern (Stackern), die mehrere MTPs aufnehmen und abgeben können.

Die Module haben eine geringere Komplexität als das gesamte System. Das erleichtert die Wartung und Integration von neuer Hardware und auch das Austesten von neuen Prozessen. Wenn das Modul funktioniert, so ist die Einbindung ins Gesamtsystem aufgrund der standardisierten Schnittstelle gewährleistet.

Das gesamte System ist skalierbar. Module können hinzugefügt oder weggenommen werden. Ein Bandsystem als zentraler Transport lässt sich weiter verlängern

Die Leistungsfähigkeit lässt sich durch parallelisieren von Modulen erhöhen

M 04.1.0.99

In Fig.2 ist das Prinzip des synchronen / asynchronen Plattentransportes dargestellt.

Dargestellt sind zwei Module M1, M2 mit jeweils mehreren Laborgeräten C1, C2, C3, beispielsweise die für das Handling mit Proben in Mikrotiterplatten erforderlichen Pipettierer, Reader und Inkubatoren.

An Übergabestellen E1 für die Zufuhr der Mikrotiterplatten in ein Modul M1 oder M2 sowie E2 zur Ausfuhr der Mikrotiterplatten aus den Modulen erfolgt der Austausch der Module mit einem zentralen Transportsystem

(Förderband) TS , das den Transport zwischen den einzelnen Modulen , aber auch zwischen Eingabespeichereinheiten für die auszulesenden Mikrotiterplatten und Endspeichereinheiten für ausgelesenen Mikrotiterplatten übernimmt.

Die Übergabe an den Einheiten E1, E2 kann beispielsweise über Schiebeeinheiten unter Anheben und Ansenken der Mikrotiterplatten oder über Greifer erfolgen.

Fig. 3 stellt das erfindungsgemäße Gesamtsystem dar, bestehend aus dem zentralen Transportsystem TS und Ein - und Ausführpuffern EAP zur Übernahme oder Übergabe von Mikrotiterplatten an/ vom Transportsystem TS.

Dies ist in Fig.4 detailliert dargestellt.

Hier übernimmt ein Drehteller mit seinen 2 Plattenpositionen die Funktion des Ein und Ausgabepuffers. Über eine Stopp und Schubvorrichtung (SSV wird eine Mikrotiterplatte vom zentralen Transportsystem TS angehoben und auf dem Drehteller befördert.

Dieser dreht sich und in der gegenüberliegenden Stellung wird die Mikrotiterplatte von weiteren Drehtellern DT übernommen, über die auch die Zufuhr zu in den Moduleinheiten M 2,3,4 vorgesehenen Inkubatoren IK, Dispensern DP und Pipettierrobotern PR erfolgt.

Auf der jeweils abgewandten Seite des Drehtellers kann gleichzeitig eine bereits bearbeitete Mikrotiterplatte aufgeladen werden, die bei der Drehung

des Drehtellers dann in Richtung des Modulausgangs oder eines Staplers ZP zum Stapeln der Mikrotiterplatten transportiert werden kann.

Die Kollisionsfreiheit kann beispielsweise über einen Sensor gewährleistet werden, der erkennt, ob die jeweilige Seite des Drehtellers frei ist, so daß eine Mikrotiterplatte zum Rücktransport aufgeladen werden kann.

Eine weitere denkbare Variante wäre ein getakteter Betrieb, so daß der Drehteller immer eine Platte einführt und eine andere Platte ausführt.

Bestandteil des Moduls kann auch der Reader RE zum optischen Auslesen der Mikrotiterplatten sein, hier beispielsweise dargestellt im Modul M3.

Die Auslesung mittels des Readers kann ein- oder mehrmals erfolgen, sowohl im Durchlicht oder auch im Auflicht, wobei Absorption, Fluoreszenz, Lumineszenz, Szintillation oder andere auftretende Effekte für die Einzelproben bestimmt werden können.

Die Erfassung der Fluoreszenz ist beispielsweise in /1, Seite 357,365 beschrieben.

In den Modulen können zusätzliche Zwischenspeicher ZP für die MTP vorgesehen sein.

Beispielsweise kann auch über das Modul M2 die Probenvorbereitung erfolgen und im Modul M3 die Auslesung über einen optischen Reader RE.

In Modul 1 ist hier ein Plattenspeicher PSP vorgesehen, der über ein Transfersystem TRS und einen Drehteller DT mit dem Transportsystem TS in Verbindung steht.

Modul 5 ist zusätzlich mit Geräten bestückbar und über einen Drehteller mit TS verbunden.

M 04.09.99

Patentansprüche:

1.

Transportsystem zum Handling und Transport von Mikrotiterplatten ,
vorzugsweise für den Einsatz in
High Throughput Screening, Diagnostik und / oder
Kombinatorischer Chemie
bestehend aus Modulen mit Mitteln zur Probenvorbereitung und/ oder
Probeneinfüllung und/ oder optischen Auslesung und/ oder

Plattenspeicherung und/ oder weiteren Verarbeitungs-oder Ausleseschritten,
mit einem

innermodularen Transportsystem zum Transport der Mikrotiterplatten
zwischen den verschiedenen Mitteln
sowie mindestens einem zentralen Transportsystem zum asynchronen
Plattentransfer zwischen einzelnen Modulen über Ein- Ausgabepuffer.

2. Transportsystem nach Anspruch 1, wobei

Ein- und Ausgabepuffer, sowie Plattentransporteinheiten in den Modulen
vorgesehen sind

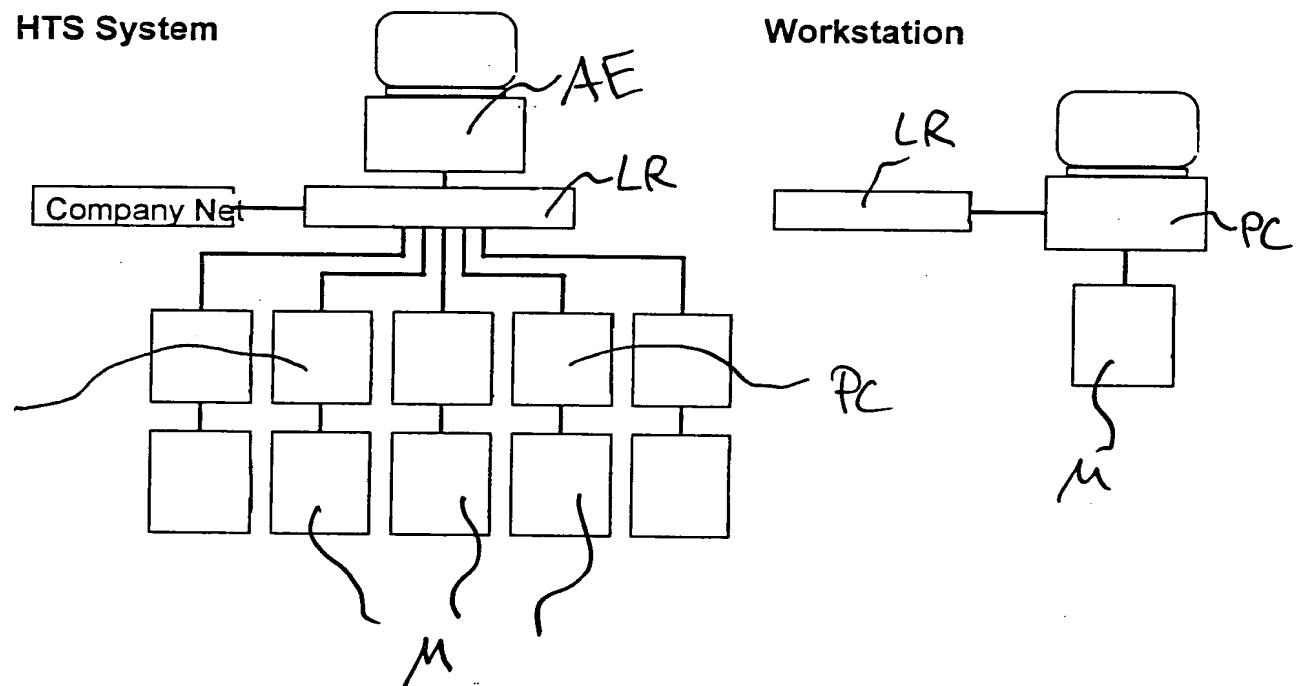
3. Transportsystem nach Anspruch 1 oder 2 , wobei die Platten mittels
Drehteller mit Schubeinheiten transportiert werden.

4. Transportsystem nach einem der Ansprüche 1-4, wobei

Einzelmodule mindestens teilweise jeweils mit einzelnen Systemen innerhalb
des Moduls verbundene Lokalrechner mit nach außen standardisierter
Schnittstelle aufweisen , wobei mittels eines Leitrechners über diese
Schnittstellen der Transport und/ oder die Verarbeitung und/ oder die
Bestückung und/ oder das optische Auslesen gesteuert wird.

M 04-09-99

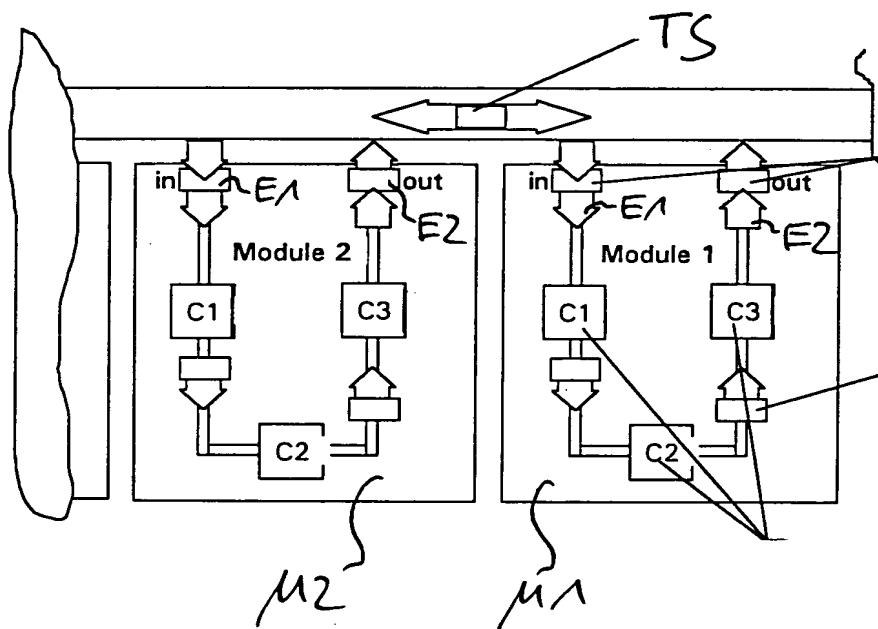
Fig. A



7325

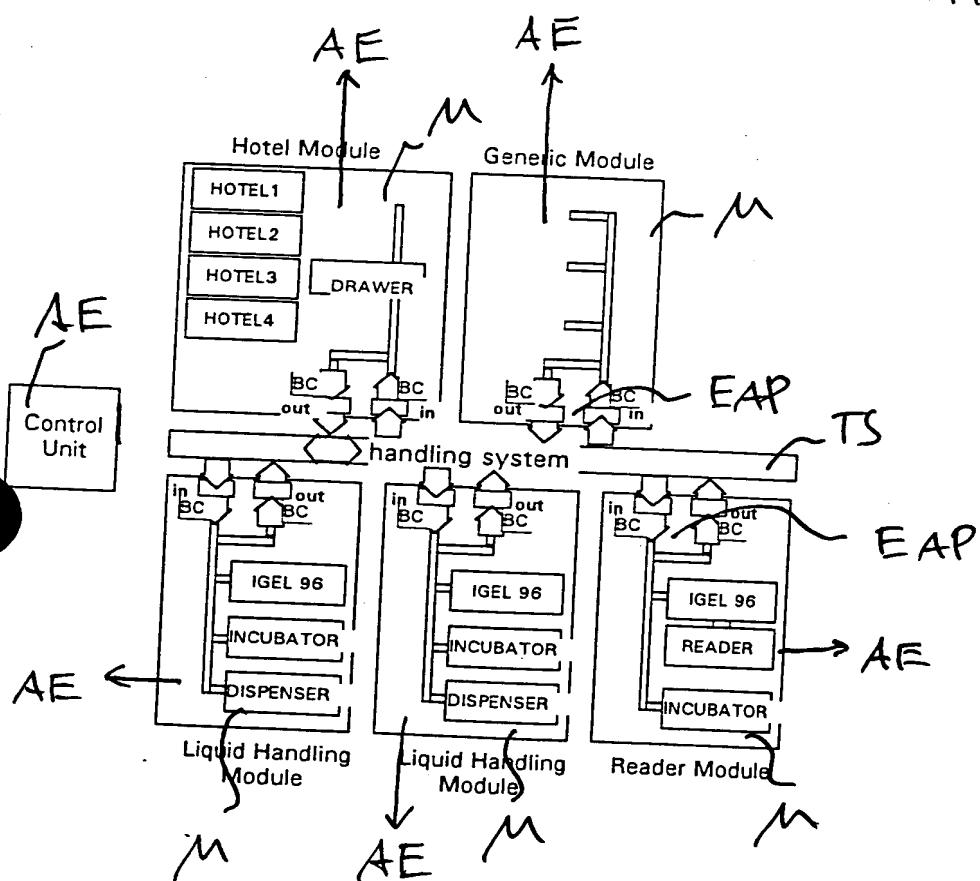
M 04.09.99

Fig.2



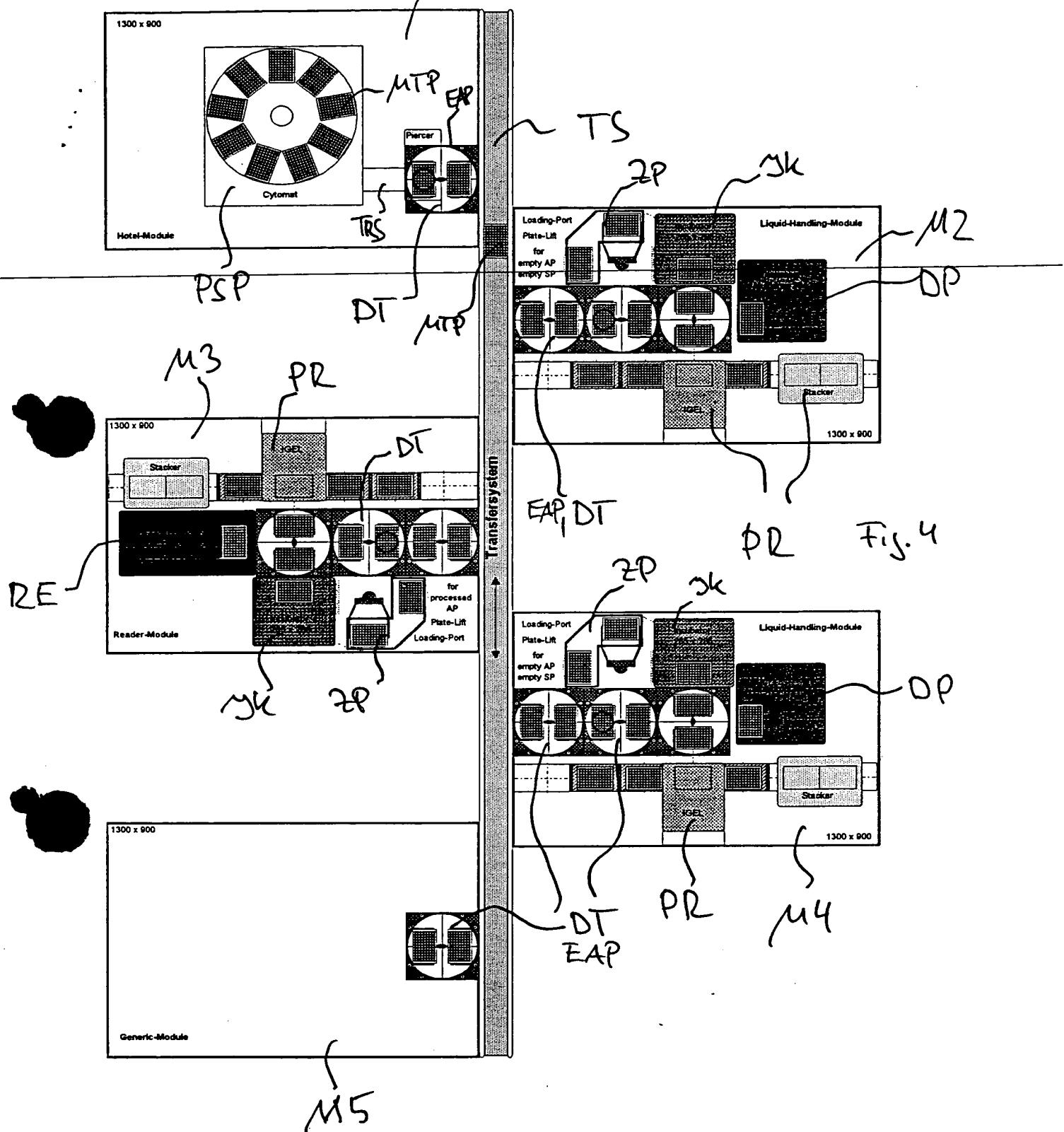
M 04.09.99

Fig. 3



7325

IN 04.09.99



Neue Wirkstoffe durch kombinatorische Chemie

Verfahren, mit denen sich aus mehreren Sätzen von chemischen Bausteinen in kurzer Zeit sämtliche möglichen Kombinationen erzeugen lassen, liefern bei geschickter Wahl der Bausätze Myriaden potentieller Wirkstoffe, aus denen man mit Screening-Verfahren die aussichtsreichsten auslesen kann.

Von Matthew J. Plunkett und Jonathan A. Ellman

P.D. 1997
p. 28-35 = 8

Das Immunsystem bekämpft Infektionen unter anderem mit so genannten Antikörpern, die sich an die eingedrungenen Krankheitserreger heften. Etwa eine Billion verschiedener solcher Proteine kann der Körper herstellen, indem er einfach aus mehreren Sortimenten möglicher Bestandteile beliebige Kombinationen bildet. Statt für jeden neuen Krankheitserreger eigens einen speziellen Antikörper maßzuschneidern – was viel zu aufwendig wäre –, konfrontiert das Immunsystem den Ein dringling mit der Armada der vorhandenen Versionen, wobei sich von alleine herausstellt, welche darunter die beste Passform haben und sich somit am stärksten anheften.

Letztendlich führt das Immunsystem also ein Massenscreening seines Antikörpervorrats durch, um die am besten geeigneten Exemplare zu finden und diese dann gezielt in großen Mengen zu produzieren. Seit einigen Jahren eifern wir und Chemiker andernorts bei der Entwicklung neuer Arzneimittel diesem natürlichen Vorbild nach. Ähnlich wie das Immunsystem erzeugen wir durch systematisch variiertes Aneinanderfügen von Bausteinen eine große Anzahl verwandter Substanzen, die wir dann auf ihre therapeutische Wirksamkeit durchmustern.

Dieser kombinatorische Ansatz unterscheidet sich grundlegend von der traditionellen Suche nach neuen Wirkstoffen. Dabei prüfen Mitarbeiter von Pharmafirmen wahllos so ziemlich alle Substanzen, deren sie **habhaft** werden – synthetische Verbindungen ebenso wie Stoffe, die aus Bakterien, Pflanzen oder anderen natürlichen Quellen stammen –, auf Anzeichen **pharmazeutischer Aktivität**. Sobald sie auf eine **erfolgversprechende** Substanz (eine sogenannte **Leitverbindung**) stoßen, **modifizieren** sie diese Schritt für Schritt und **testen** jeweils, wie sich die Änderung auf die chemischen und biologischen **Eigenschaften** ausgewirkt hat.

Dieses **Verfahren** liefert in vielen Fällen zwar im **Endergebnis** einigermaßen **wirksame Verbindungen** mit tolerablen Nebenwirkungen. Doch der Aufwand ist enorm: Für jedes so entwickelte neue Arzneimittel, das auf den Markt kommt, wurden **Tausende** ähnlicher Verbindungen **synthetisiert**, **erprobt** und schließlich **verworfen**. Das kostet Zeit und Geld: Der Weg von einer **Leitverbindung** zum **Präparat in der Apotheke** zieht sich über Jahre hin und **verschlingt** Hunderte von Millionen **Mark**.

Zwar wurde das klassische Verfahren durch **schnellere** und **zuverlässigere** Screening-Tests verbessert; außerdem hat man zunehmend gelernt, wie sich ein

Wirkstoff durch welche Modifikationen verändern lässt. Aber mit dem Fortschritt in der Medizin ist auch der Bedarf an Medikamenten gestiegen, die gezielt in Krankheitsprozesse eingreifen, wohingegen die Auswahl an noch nicht untersuchten potentiellen Wirkstoffen stetig schrumpft. Dabei sind moderne kalorimetrische Screeningverfahren, welche die Affinität eines potentiellen Wirkstoffs zu seiner Zielstruktur über die bei der Anlagerung freigesetzte Bindungsenergie messen, so leistungsfähig, daß man damit einige zehntausend Moleküle pro Monat durchtesten kann. Deshalb braucht die Forschung einerseits viel mehr Verbindungen für das Screening und andererseits ein Verfahren, das Leitverbindungen liefert, deren Optimierung nur noch wenige Feinabstimmungen erfordert.

Die kombinatorische Chemie kommt diesem Bedarf entgegen. Mit ihr lassen sich in kürzester Zeit mehrere Millionen strukturell verwandter Substanzen erzeugen. Und dies sind nicht etwa beliebige Moleküle, sondern ausgewählte Verbindungen, bei denen aufgrund der Eigenschaften der Ausgangsmaterialien zu erwarten ist, daß zumindest einige in mehr oder weniger ausgeprägter Form die gewünschte Aktivität zeigen. Durch Screening des resultierenden Verbindungs pools kann man die wirksamsten Varianten

ten auslesen. Damit liefert die kombinatorische Chemie schneller und zu niedrigeren Kosten als je zuvor aussichtsreiche Kandidaten für die klinische Prüfung.

Die Suche nach der richtigen Kombination

Die Herstellung der Sammlungen („Bibliotheken“) von Substanzen für das Screening ist denkbar einfach: Mittels chemischer Standardreaktionen fügt man ausgewählte Bausteine zu vielen verschiedenen größeren Strukturen zusammen, indem man sie in unterschiedlicher Kombination der Reihe nach aneinanderhängt. Als abstraktes Beispiel betrachten wir vier Moleküle, die schematisch mit A1, A2, B1 und B2 benannt seien. Die Bezeichnungsweise drückt aus, daß die Moleküle des ersten und zweiten Paars jeweils strukturell miteinander verwandt sind und zur selben Verbindungsklasse gehören. Die beiden Klassen seien dabei so gewählt, daß ihre Mitglieder miteinander zu neuen Molekülen reagieren können, unter denen sich vielleicht auch ein wirksames Arzneimittel befindet. Das Prinzip der kombinatorischen Chemie besteht nun darin, einfach alle möglichen Kombinationen herzustellen – A1-B1, A1-B2, A2-B1 und A2-B2 – und auf Wirksamkeit zu überprüfen.

Natürlich wird im Ernstfall mit wesentlich mehr Bausteinen gearbeitet. So könnte man etwa 30 strukturell verwandte Verbindungen auswählen, die alle eine Aminogruppe ($-NH_2$) tragen, und dazu einen zweiten Satz von 30 Substanzen aussuchen, die sämtlich eine Carboxylgruppe ($-COOH$) enthalten. Unter geeigneten Bedingungen ließe sich jedes Amin mit jeder Carbonsäure unter Abspaltung von Wasser (H_2O) zu einem Amid ($-CONH-$) verknüpfen, was insgesamt 30×30 , also 900, verschiedene Kombinationen ergäbe. Nähme man ein drittes Sortiment von 30 Bausteinen hinzu, so betrüge die Gesamtzahl der Strukturen am Ende sogar 27 000 ($30 \times 30 \times 30$). Je mehr Sätze und Substanzen pro Satz, desto größer die Zahl der möglichen Kombinationen.

In der Praxis kann man zwischen zwei grundlegenden kombinatorischen Verfahren wählen. Das erste – die sogenannte Parallelsynthese – hat Mitte der achtziger Jahre H. Mario Geysen (jetzt bei der Firma Glaxo Wellcome) erfunden. Ursprünglich wollte er damit in kürzester Zeit herausbekommen, welcher kleine Abschnitt eines gewissen großen Proteins sich an einen Antikörper gebunden hatte. Dazu erzeugte er viele kurze Proteinstücke (Peptide), indem er mehrere

Aminosäuren (die Bausteine von Peptiden und Proteinen) in verschiedenen Permutationen zusammenfügte, wobei er Dutzende bis Hunderte von Reaktionen gleichzeitig durchführte. Dann prüfte er, welches der entstandenen Peptide sich an den Antikörper heftete; es mußte aus derselben Abfolge von Aminosäuren bestehen wie der gesuchte Proteinabschnitt.

Bei einer Parallelsynthese werden alle Produkte getrennt in *ihrem* eigenen Reaktionsgefäß zusammengefügt. Das geschieht oft auf einer Mikrotitrationsplatte: einer flachen Plasticscheibe mit typi-

schen 8×12 kleinen Vertiefungen. In jeder Mulde befinden sich jeweils einige Milliliter der Flüssigkeit, in der die Reaktion stattfinden soll. Die Anordnung in Reihen und Spalten erleichtert das systematische Kombinieren der Bausteine und die Identifikation der Produkte.

Will man zum Beispiel mit der beschriebenen Reaktion eine Serie von Amiden herstellen, indem man acht Amine und zwölf Carbonsäuren kombiniert, so tropft man zweckmäßigerweise in die Vertiefungen der ersten Reihe eine Lösung mit dem ersten Amin, in die der

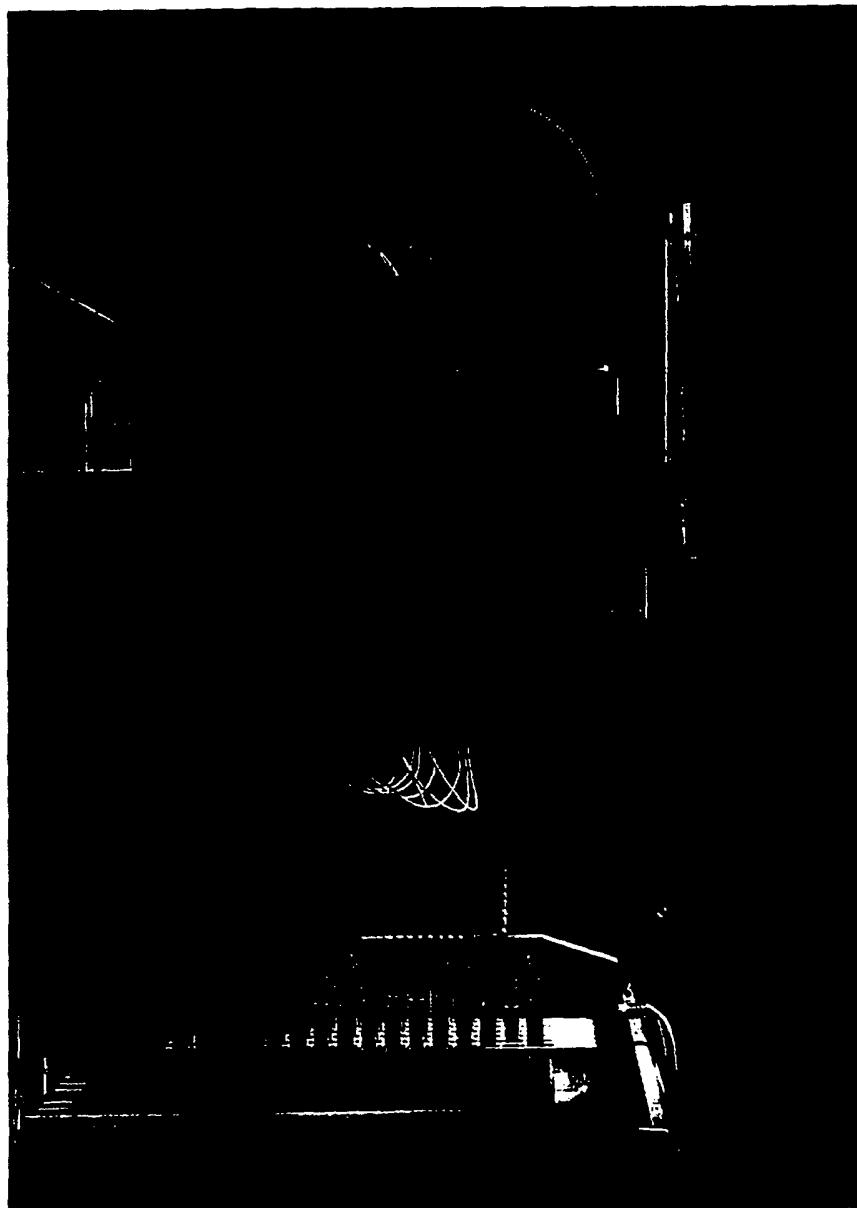


Bild 1: Ein Roboter tropft Chemikalien, die als Bausteine für die reihenweise Synthese von großen Mengen systematisch variiert Verbindungen dienen, in die entsprechenden Reagenzgläser. Die Automatisierung

bewirkt, daß die kombinatorische Chemie noch schneller und präziser potentielle neue pharmakologisch Wirkstoffe liefert.

zweiten Reihe eine mit dem zweiten Amin, und so weiter. Danach gibt es in jede Spalte je eine Carbonsäure. Insgesamt 96 entstehenden Verbindungen lässt sich dann leicht anhand ihres Reihen- und Spaltenindex identifizieren.

Häufig wird bei einer kombinatorischen Synthese der erste Bausteinsatz an inerte mikroskopische Polystyrolkugelchen (oft als fester Träger bezeichnet)

gebunden. Nach jeder Umsetzung kann man dann alles Material, das nicht reagiert hat, einfach abspülen, wobei allein die an den Kugeln haftenden erwünschten Produkte zurückbleiben. Der zusätzliche Aufwand, den das Anheften des ersten Bausteins und das spätere Ablösen des fertigen Moleküls bedeuten, wird durch die leichtere Reinigung der Zwischenprodukte mehr als aufgewogen.

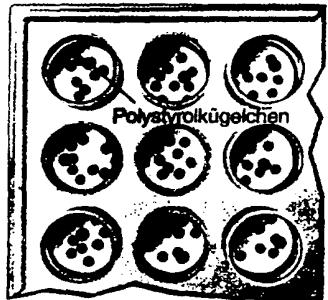
Heutzutage übernehmen Automaten die Routinearbeiten der Parallelsynthese wie das Einbringen kleiner Mengen reaktiver Substanzen in die Vertiefungen (Bild 1). Dies macht das Verfahren präziser und weniger mühselig. Bei dem Pharmaunternehmen Parke-Davis mit Hauptsitz in Morris Plains (New Jersey) wurde ein Roboter für die automatisierte Parallelsynthese konstruiert, der 40 Verbindungen auf einmal herstellen kann, und bei der Arzneimittelfirma Onogen in Carlsbad (Kalifornien) ist nun ein Automat in Betrieb, der bis zu 1000 Verbindungen am Tag zu synthetisieren vermag. Der Zeitbedarf für eine Parallelsynthese ist grob proportional zur Zahl der herzustellenden Verbindungen: Für doppelt so viele Substanzen braucht man fast doppelt so lange. Aus solch praktischen Gründen lassen sich auf diesem Wege nur Bibliotheken mit einigen 10 000 Verbindungen herstellen.

Eine elegante moderne Variante der Parallelsynthese arbeitet nach dem Vorbild der lithographischen Verfahren zur Herstellung von Computerchips mit einer gezielten Aktivierung durch selektives Belichten (Bild 4). Dabei werden die Moleküle des ersten Bausteinsatzes an bestimmte Stellen eines plattenförmigen Trägers fixiert. Sie tragen am freien Ende eine lichtempfindliche Schutzgruppe, die sie am Reagieren hindert. Durch gezieltes Belichten kann man diese Gruppen selektiv entfernen: an den exponierten Stellen verbindet sich, wenn man die Platte in eine Lösung mit einem zweiten Baustein taucht (der ebenfalls am einen Ende eine Schutzgruppe trägt), dieser (mit seinem freien Ende) mit den Molekülen des ersten Satzes. Auf diese Weise kann man an verschiedenen Stellen der Platte in beliebiger Reihenfolge weitere Bausteine anfügen. Die als lichtgesteuerte Synthese bezeichnete Methode wurde 1990 bei der Firma Affymax in Palo Alto (Kalifornien) entwickelt, deren Mitarbeiter damit auf einer Fläche von weniger als zwei Quadratzentimetern 65 536 verschiedene Peptide erzeugten.

Parallelsynthese

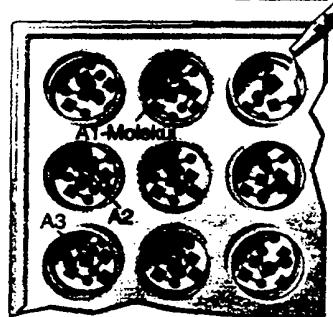
1. Schritt

In die – üblicherweise $8 + 12 = 96$ – Vertiefungen einer Mikrotitrationsplatte, von der hier nur die linke obere Ecke dargestellt ist, gibt man in einer Flüssigkeit dispergierte Polystyrolkugelchen (farbige Kreise).



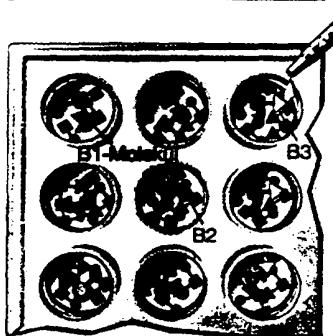
2. Schritt

Man fügt den ersten Satz an Molekülen – die A-Gruppe (Quadrate) – hinzu, indem man eine Lösung mit den A1-Molekülen in die Vertiefungen in der ersten Reihe, eine mit den A2-Molekülen in die Mulden der zweiten Reihe und so weiter tropft. Diese Moleküle enthalten eine Gruppierung, über die sie sich an die Oberfläche der Polystyrolkugeln heften. Anschließend wäscht man in jeder Vertiefung durch Zugabe von Lösungsmittel und Abfiltrieren nicht an die Kugeln gebundene überschüssige Reagentien aus.



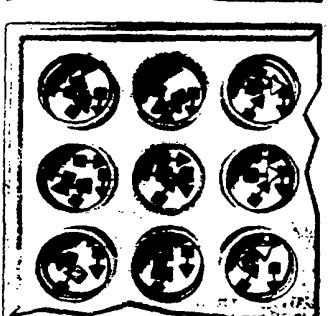
3. Schritt

Man fügt den zweiten Satz an Molekülen – die B-Gruppe (Dreiecke) – hinzu, indem man B1 in die Vertiefungen in der erste Spalte, B2 in die der zweiten Spalte und so weiter tropft. Die B-Moleküle verbinden sich so in jeder möglichen Kombination mit den A-Molekülen, und jede Mulde enthält genau eine Kombination, die durch ihren Reihen-Spalten-Index festgelegt ist. Wieder werden am Ende überschüssige Reagentien ausgewaschen.



4. Schritt

Nach Herstellung der Bibliothek aus 96 verschiedenen AB-Kombinationen spaltet man die Moleküle von den Polystyrolkugeln ab. Sie können nun auf biologische Aktivität durchmustert werden.



Teile und mische!

Das zweite Verfahren zum Erstellen einer kombinatorischen Substanzbibliothek arbeitet nach dem Prinzip „Teile und mische!“. Árpád Furka – inzwischen bei der Firma Advanced Chemtech in Louisville (Kentucky) – hat es in den späten achtziger Jahren entwickelt. Anders als bei der Parallelsynthese, wo jede Substanz für sich bleibt, wird dabei eine Mischung verwandter Verbindungen in ein und demselben Reaktionsgefäß er-

zeugt. Das verringert den apparative Aufwand beträchtlich, und die Anzahl der Syntheseprodukte kann in die Millionen gehen. Dafür wird es jedoch sehr kompliziert, die Übersicht über die riesigen Mengen an Verbindungen zu behalten und die anschließenden Tests auf biologische Aktivität auszuwerten.

Betrachten wir als Beispiel eine Synthese mit drei Substanzklassen A, B und C und drei Stoffen pro Klasse. In diesem Falle fängt man mit drei Gefäßen an. Im ersten bindet man A1-Moleküle an Polystyrolkugeln, im zweiten A2- und im dritten A3-Moleküle; dabei wird jede Kugel jeweils mit bis zu 10 Billionen Molekülen derselben Sorte bestückt, so daß sie am Ende wie ein mit Stacheln gespickter Kaktus aussieht. Dann schüttet man alles in einen Topf, röhrt kräftig und verteilt das Substanzgemisch wiederum auf drei Gefäße, so daß jedes alle drei Verbindungen enthält. Nun werden in den ersten Behälter B1-, in den zweiten B2- und in den dritten B3-Moleküle gegeben. Nach Vereinigen, Mischen und erneutem Aufteilen fügt man in der nächsten Runde die C-Moleküle hinzu, was 27 verschiedene Verbindungen ergibt.

Diverse Pharmaunternehmen haben auch dieses Verfahren mittlerweile automatisiert. Die Firma Chiron Therapeutics in Emeryville (Kalifornien) war unter den ersten: Dort wurde ein Robotersystem entwickelt, mit dem sich Millionen von Verbindungen in einigen Wochen herstellen lassen. Der Automat setzt jeweils die benötigten Chemikalien zu und mischt und teilt die Kugelchen mit den Syntheseprodukten in jedem Schritt auf.

Um in dem Substanzgemisch am Ende die wirksamste Komponente zu identifizieren, testet man zuerst den Inhalt der Gefäße nach der letzten Umsetzung und ermittelt jeweils die mittlere Aktivität. Der nächste Schritt ist schwieriger: In dem Behälter mit dem wirksamsten Gemisch jene Baustein-Kombination zu identifizieren, welche die gewünschte biologische Aktivität hat. Doch auch dazu gibt es inzwischen eine Reihe von Verfahren.

Die meisten machen sich zunutze, daß alle Moleküle, die an einer einzelnen Kugel hängen, identisch sind. So fügt man bei einer Methode, die Kit S. Lam von der Universität von Arizona in Tempe entwickelt hat, zu dem Gemisch das mit einem Farbstoff markierte Zielmolekül, und kann dann leicht optisch erkennen, mit welchen Kugeln es sich verbündet (Bild 3). Diese sortiert man mit Mikropinzetten aus, löst die daran gebundenen Substanzen ab und bestimmt mit chemischen Analyseverfahren ihre Zusammensetzung. Leider funktioniert das Verfah-

n nur für gewisse Verbindungen wie Peptide und kurze DNA-Moleküle (DNA ist die internationale Kurzbezeichnung für die Erbsubstanz Desoxyribonucleinsäure).

Andere Forschungsgruppen haben Methoden entwickelt, jeder Kugel ein leicht lesbares Etikett zu verpassen, das die Reihenfolge der Untereinheiten festhält, aus denen die anhängenden Mole-

külen gebaut wurden – sozusagen ein chemischer Strichcode, der sich mit jedem neu angefügten Baustein um eine Markierung verlängert. Am Ende braucht man nur die Striche der Reihe nach abzulesen, um den Aufbau der Verbindungen auf der jeweiligen Kugel zu ermitteln. Wissenschaftler bei der Biotechnologiefirma Pharmacopeia in Princeton (New Jersey) konnten mit effizienten Etikettie-

Synthese nach dem Prinzip „Teile und Mische“

1. Schritt

Man verteilt den ersten Satz an Bausteinen – die A-Gruppe (Quadrate) – auf verschiedene Reagenzgläser, die jeweils Dispersionen von Polystyrolkugeln (farbige Kreise) in einer Flüssigkeit enthalten. Normalerweise umfaßt ein solcher Satz Dutzende von Verbindungen; der Einfachheit halber sind es hier jedoch nur drei. Die A-Moleküle heften sich – und zwar mehrere auf einmal (anders als hier gezeigt) – an die Oberfläche der Polystyrolkugeln. In Lösung gebliebene überschüssige Reagentien werden ausgewaschen.

2. Schritt

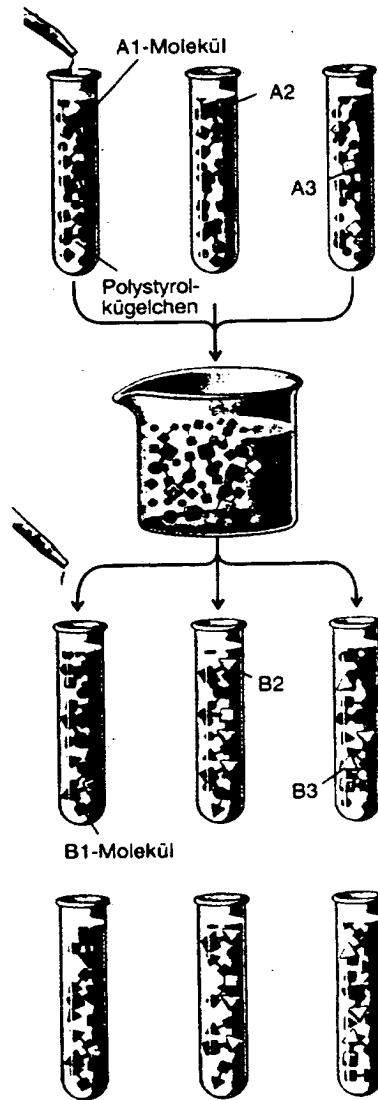
Der Inhalt aller Reagenzgläser wird zusammengeschüttet.

3. Schritt

Das Gemisch wird wiederum auf mehrere Reagenzgläser aufgeteilt. Nun fügt man den zweiten Satz an Molekülen – die B-Gruppe (Dreiecke) – hinzu, indem man B1 in das erste Reagenzglas tropft, B2 in das zweite und so weiter. Es folgt das übliche Auswaschen. Schritte 2 und 3 können je nach Anzahl der anhängenden Molekülsätze mehrfach wiederholt werden.

4. Schritt

Die Produktmoleküle werden von den Polystyrolkugel abgespalten. Jedes Reagenzglas enthält nun eine Mischung aus verschiedenen Baustein-Kombinationen, die sich nicht ohne weiteres identifizieren lassen. Oft prüft man zunächst den gesamten Inhalt jedes Reagenzglases auf seine mittlere biologische Aktivität. Da alle Moleküle in einem Gefäß die zuletzt hinzugefügte Komponente gemeinsam haben (entweder B1, B2 oder B3 in unserem Beispiel), erfährt man so, welche davon die wirksamste Verbindung ergibt. Angenommen, es sei B2, kann man dann die Synthese wiederholen, indem man die A-Moleküle nun in getrennten Behältern nur mit B2 reagieren läßt und die Produkt einer weiteren Prüfung



unterzieht. Eine Alternative ist, die Polystyrolkugeln mitsamt den angeknüpften Produkten zu testen und diejenigen auszulesen, welche die gewünschte Aktivität zeigen. Erst danach spaltet man von diesen die (identischen) Moleküle ab und analysiert sie auf ihre Zusammensetzung.

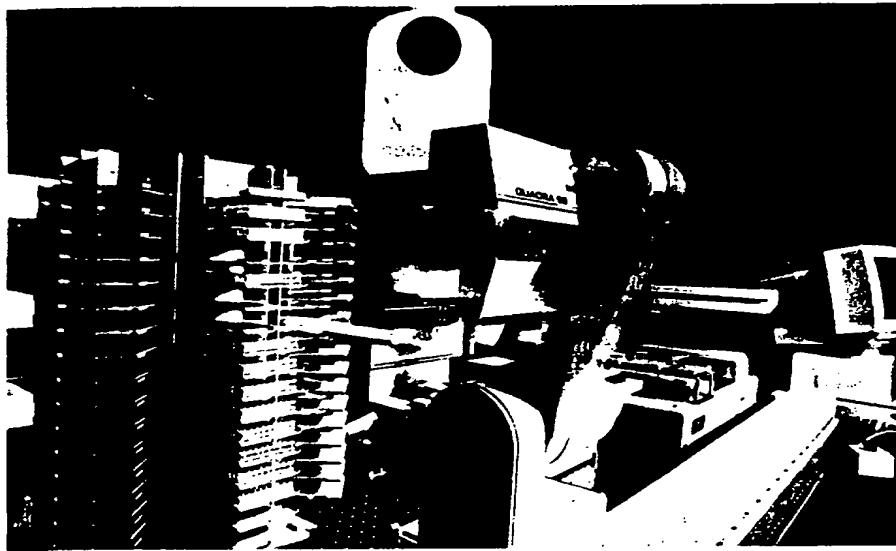


Bild 2: Auch das Durchmustern kombinatorischer Substanzbibliotheken nach Stoffen mit erwünschter biologischer Akti-

vität ist automatisierbar. Hier befördert ein Screening-Roboter Mikrotitrationssplatten mit Reaktionsprodukten zum Prüfgerät.

lungstechniken, zu denen W. Clark Still von der Columbia-Universität in New York die Grundideen beigesteuert hatte, sehr zuverlässig eigene kombinatorische Substanzbibliotheken auswerten. Wegen der immer noch bestehenden Schwierigkeiten bei der Identifikation von Verbindungen aus einer Teile-und-Mische-Synthese bevorzugen die meisten Pharmaunternehmen jedoch weiterhin das Parallelverfahren.

Das Erstellen von Wirkstoffbibliotheken

Beide Grundmethoden der kombinatorischen Chemie dienten ursprünglich zur Herstellung von Peptiden. Das hatte einen rein praktischen Grund: Das An-einanderhängen von Aminosäurebausteinen an einem festen Träger ist eine biochemische Elementarreaktion, die schon seit den sechziger Jahren perfektioniert

war. Mit geeigneten Reagentien unter den richtigen Bedingungen erfordert sie nur einfaches Mischen und Rühren und läuft praktisch mit 100prozentiger Ausbeute ab. Dadurch lassen sich mehrstufige Synthesen auf festem Träger völlig ohne Reinigung der Zwischenprodukte durchführen: oft können sogar die Endprodukte ungereinigt zum Screening gehen.

Große kombinatorische Peptidbibliotheken lassen sich außerdem auf relativ einfache Weise mit gentechnischen Methoden gewinnen. Dazu führt man beispielsweise in das Gen für das Oberflächenprotein eines Phagen – eines Virus, das Bakterien befällt – ein kurzes DNA-Stück (Oligonucleotid) ein, das für ein bestimmtes Peptid codiert. Daraufhin produziert dieser Phage und seine gesamte Nachkommenschaft das entsprechende Peptid und präsentiert es an seiner Oberfläche. Durch systematische Variation der eingeführten DNA-Stücke konnte man so schon 1990 Bibliotheken mit 10 bis 100 Millionen Peptiden erzeugen, von denen viele eine bemerkenswerte Affinität zu diversen Rezeptoren zeigten – also zu Strukturen, an denen sich im Organismus Hormone, Neurotransmitter oder andere Botenstoffe anlagern und dadurch ihre jeweilige Wirkung ausüben.

Allerdings taugen Peptide, obwohl sie in biologischen Systemen eine sehr wichtige Rolle spielen, kaum als Arzneimittel: denn sie werden nur schlecht durch die Magenwand resorbiert, im Darm gespalten und selbst beim Injizieren schnell wieder aus dem Blutstrom entfernt. Um ihre Beständigkeit gegenüber Spaltenzymen (Proteasen) zu erhöhen, ist man deshalb auf künstliche Aminosäuren als Bausteine ausgewichen. Dennoch begann sich die Pharmaindustrie erst verstärkt für die kombinatorische Chemie zu interessieren, als abzusehen war, daß damit auch nicht-peptidische Wirkstoffe – etwa aus der Klasse der Benzodiazepine – zugänglich sind.

Benzodiazepine gehören zu den meistverschriebenen Arzneimitteln und dienen – wie der bekannteste Vertreter Diazepam (Valium) – hauptsächlich als Tranquillizer zur Stimmungsaufhellung, zum Lösen von Angst-, Spannungs- und Unruhezuständen sowie als Schlafmittel. Das Spektrum umfaßt aber auch eine Reihe von Derivaten mit weiteren therapeutischen Wirkungen. Dazu zählen krampflösende und schlafverhindernde Mittel, Gegenspieler des blutplättchenaktivierenden Faktors (der bei der Blutgerinnung eine bedeutende Rolle spielt), Hemmstoffe für das Enzym Reverse Transkriptase des AIDS-Erregers HIV

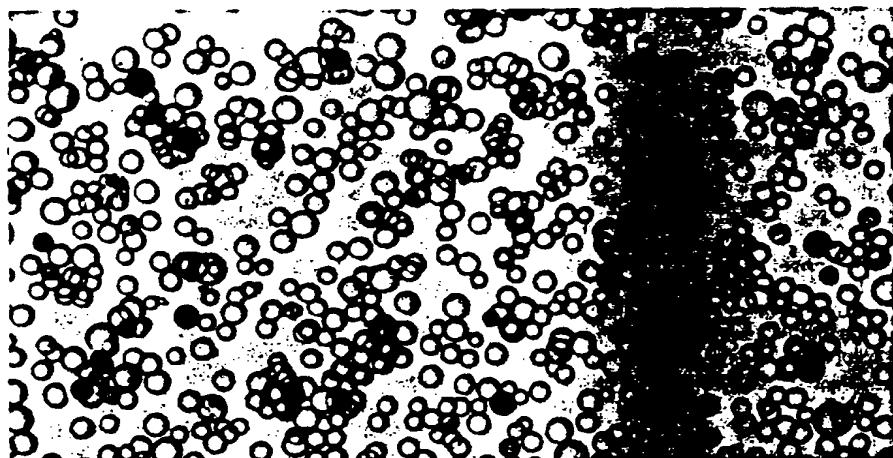


Bild 3: Die Startmoleküle einer kombinatorischen Synthese heftet man oft an Polystyrolkugeln und fügt schrittweise die weiteren Bausteine an. Dadurch lassen sich die am festen Träger haftenden Produkte leicht von den gelösten überschüssigen Reagentien trennen. Außerdem kann man auf diese Weise unterschiedliche Baustein-Kombinationen im gleichen Reaktionsgefäß synthetisieren, was das Verfahren vereinfacht. An ein und demselben Kugelchen haften stets

identische Produkte, die sich bei Durchmusterungen auf Wirksamkeit prüfen lassen. An den rot erscheinenden Partikeln auf dieser etwa 100fach vergrößerten Mikrophotographie hängen zum Beispiel Moleküle, an die sich bei einem Reihentest künstliche Steroidrezeptoren angelagert haben. Man kann die betreffenden Kugelchen aussortieren und die Zusammensetzung der anhaftenden Moleküle analytisch bestimmen.

(Human-Immunschwäche-Virus) und Inhibitoren des Enzyms Ras-Farnesyltransferase, das an der Entstehung bestimmter Krebsarten beteiligt ist.

Wegen ihrer weitgefächerten biologischen Aktivität waren die Benzodiazepine auch die erste Verbindungsklasse, bei der man mittels kombinatorischer Chemie nach neuen therapeutisch nutzbaren Vertretern suchte. Im Jahre 1992 beschrieb einer von uns (Ellman) zusammen mit Barry Bunin (ebenfalls an der Universität von Kalifornien in Berkeley) eine Methode zu ihrer Synthese auf festen Trägern: das Verfahren ermöglichte die Erstellung von Bibliotheken mit mehreren tausend Derivaten.

Kürzlich entwickelten wir eine verbesserte Synthesemethode, die einen einfachen Zugang zu einer noch viel größeren Zahl von Benzodiazepinen bietet. Die anspruchsvollste Aufgabe beim Entwurf einer kombinatorischen Synthesemethode ist, jene Reaktionsbedingungen zu ermitteln, bei denen sich möglichst wenig störende Nebenprodukte bilden. Diese Feinabstimmung zum Vermeiden von Verunreinigungen beschäftigte uns über ein Jahr; als wir schließlich das optimale Verfahren gefunden hatten, vermochten wir in nur zwei Monaten zusammen mit Bunin in einer Parallelsynthese 11 200 Verbindungen herzustellen.

In den verschiedenen Benzodiazepin-Bibliotheken konnten wir mehrere Substanzen mit interessanten biologischen Wirkungen identifizieren. So fanden wir in Zusammenarbeit mit Victor Levine und Raymond Budde vom M.-D.-Anderson-Krebszentrum in Houston (Texas) einen Hemmstoff für ein Enzym, das bei Dickdarmkrebs und Osteoporose eine Rolle spielt. Ein anderes Benzodiazepin, das wir gemeinsam mit Gary Glick und seinen Kollegen an der Universität von Michigan in Ann Arbor entdeckten, blockiert die Bindung von Antikörpern an einzelsträngige DNA, die beim systemischen Lupus erythematoses auftritt, einer türkischen Autoimmunerkrankung, die zur Gefäßentzündung führt und viele Organe schädigen kann. Beide Substanzen befinden sich aber noch in der ersten Testphase im Labor.

Nachdem so erwiesen war, daß sich mittels kombinatorischer Chemie auch nicht-peptidische Wirkstoffe herstellen lassen, begann sich die Pharmaindustrie auf diesem Gebiet zu engagieren. In den letzten fünf Jahren entstanden Dutzende kleiner Firmen, die sich ausschließlich mit dieser Art der Wirkstoffsuche beschäftigen, und fast alle größeren Pharmaunternehmen haben inzwischen eigene Abteilungen für kombinatorische Chemie oder arbeiten mit einem klei-

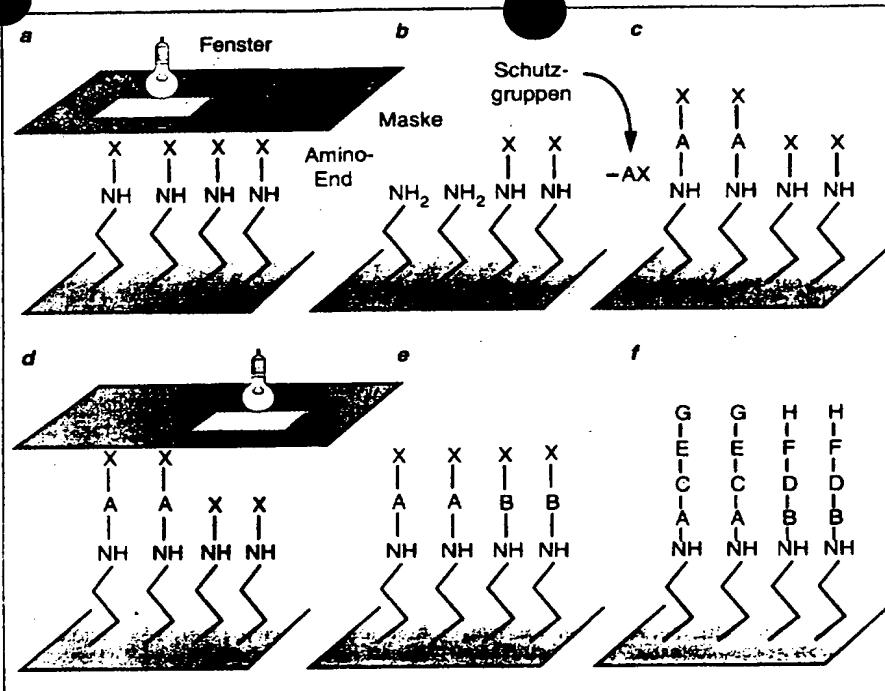


Bild 4: Die lichtgesteuerte Synthese ist ein elegantes neueres Verfahren zur Herstellung kombinatorischer Peptidbibliotheken, das sich an die in der Halbleiterindustrie gebräuchlichen lithographischen Methoden anlehnt. Dabei verwendet man Aminosäurebausteine, die an ihrem Amino-Ende mit einer lichtempfindlichen Schutzgruppe (X) versehen sind, und bindet die Moleküle des ersten Satzes über das Carboxyl-Ende an einen flachen Feststoffträger (a). Diesen deckt man mit einer Maske ab, die nur ein kleines Areal freiläßt, und entfernt dort

durch Belichten die Schutzgruppe (b). Beim Eintauchen des Trägers in eine Lösung mit einem weiteren geschützten Aminosäurebaustein (A-X), vermag dieser ausschließlich mit den freien Amino-Enden zu reagieren (c). Anschließend kann man die Maske verschieben, eine neue Stelle belichten (d) und dort eine andere Aminosäure (B) ankoppeln (e). Nach diesem Prinzip lassen sich dicht nebeneinander auf der Trägerplatte verschiedene Peptide aufbauen, deren Zusammensetzung und Position von einem Computer gespeichert werden (f).

neren, darauf spezialisierten Partner zusammen.

Die Benzodiazepine waren nur der Anfang. Mittlerweile wird kombinatorische Chemie mit einer breiten Palette von Ausgangsmaterialien betrieben. Meist verwendet man dabei kombinatorische Bibliotheken aus kleinen organischen Molekülen als Fundgruben aussichtsreicher Leitverbindungen oder zur Optimierung eines schon bekannten Wirkstoffs. Im ersten Falle werden oft große Sammlungen mit Zehntausenden oder gar Millionen von Substanzen erzeugt. Dagegen enthält eine Bibliothek, mit der die Wirksamkeit und Verträglichkeit einer existierenden Leitverbindung gesteigert werden soll, üblicherweise nur einige hundert Verbindungen.

Inzwischen haben es Wirkstoffe, die der kombinatorischen Chemie entstammen, auch schon bis zu klinischen Tests am Menschen gebracht. Wegen der Neuheit des Verfahrens konnte zwar noch keiner lange genug untersucht werden, um von der amerikanischen Gesundheitsbehörde (U.S. Food and Drug Ad-

ministration) die Zulassung zu erhalten; doch ist es nur noch eine Frage der Zeit, bis das erste solche Medikament auf den Markt kommt.

In einem weit fortgeschrittenen Entwicklungsstadium befindet sich zum Beispiel ein potentielles Arzneimittel bei dem internationalen Pharmakonzern Pfizer mit Hauptsitz in New York. Dort war 1993 mit Standardmethoden eine Leitverbindung mit einer gewissen vorbeugenden Wirkung gegen Atherosklerose („Arterienverkalkung“) entdeckt worden. Mittels Parallelsynthese konnten in einem firmeneigenen Laboratorium mehr als 1000 Derivate hergestellt werden, von denen einige 100mal wirksamer als die Leitverbindung waren. Ein daraus abgeleiteter Wirkstoff wird nun klinisch getestet. Hier zeigt sich der immense Vorteil des kombinatorischen Ansatzes: Über 1000 Substanzen auf konventionelle Art der Reihe nach herzustellen, um einige wenige mit erhöhter biologischer Aktivität zu finden, hätte einen Aufwand an Zeit und Geld bedeutet, den sich nur wenige Laboratorien leisten könnten.

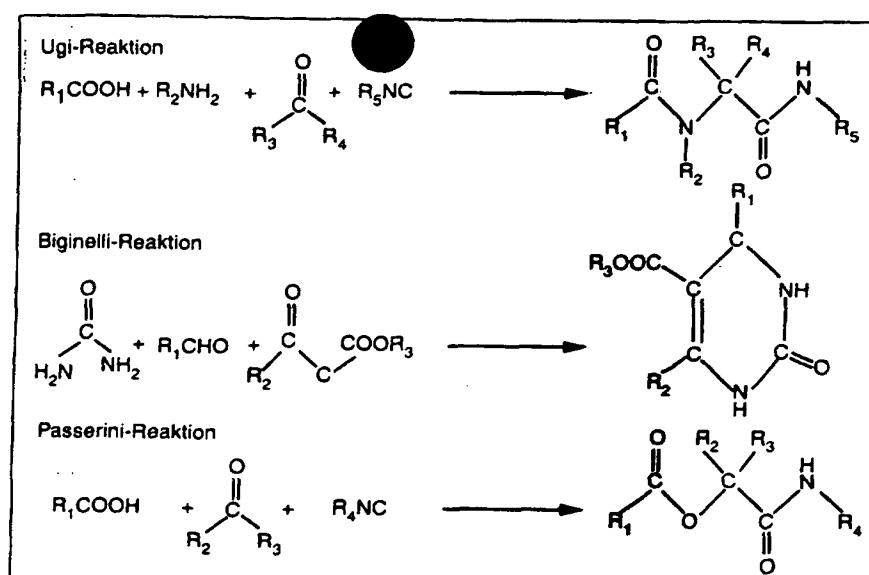


Bild 5: Die kombinatorische Synthese von Molekülen, deren Bausteine über schwer zu knüpfende Kohlenstoff-Kohlenstoffbindungen miteinander verbunden sind, ist eine Herausforderung an die Chemiker. Bislang gibt es erst wenige Reaktionen, die

sich dafür eignen. Dazu gehören die drei hier aufgeführten. Durch systematische Variation der Substituenten R_i kann man damit aus Carbonsäuren, Aminen, Isonitriilen und Ketonen eine umfangreiche kombinatorische Substanzbibliothek aufbauen.

Bei Eli Lilly, einem multinationalen Pharmakonzern mit Sitz in Indianapolis (Indiana), wurde ebenfalls mit einer Parallelsynthese ein Mittel gegen Migräne entwickelt, das jetzt in der klinischen Prüfung ist. Die zunächst aufgefundene Leitverbindung heftet sich zwar sehr stark an die gewünschte Zielstruktur, hat aber zugleich eine hohe Affinität gegenüber anderen Rezeptoren, was unerwünschte Nebenwirkungen verursacht. In einer Parallelsynthese wurden etwa 500 Derivate erzeugt: darunter war jene währlichere Substanz, die jetzt getestet wird.

Perspektiven

Sicherlich werden sich Wege finden, kombinatorische Bibliotheken noch schneller und billiger zu erzeugen. Ein schon jetzt intensiv verfolgter Ansatz ist, mit ausgeklügelten Reaktionsverfahren die Ausbeute am jeweils erwünschten Endprodukt zu erhöhen. Andere Bestrebungen gehen dahin, die Polystyrolkugeln entbehrlich zu machen. Zum einen bedeutet das Anheften des ersten Bausteins und das Ablösen des Endprodukts einen zusätzlichen Arbeitsaufwand. Vor allem aber haben feste Träger den Nachteil, daß der Zugang der Reagenzien aus der Lösung zu den gebundenen Molekülen erschwert ist, was die Ausbeuten verringern kann. Dies läßt sich vermeiden, indem man statt Polystyrolkugelchen beispielsweise Polyethylenglykol

zum Anheften der zu synthetisierenden Moleküle verwendet. Es ist in Wasser und den meisten anderen gebräuchlichen Lösungsmitteln gut, in Ether dagegen kaum löslich. Man kann somit das Anhängen eines neuen Bausteins in Lösung durchführen und danach durch Zugabe von Ether das Polyethylenglykol mit dem daran befestigten Zwischenprodukt ausfällen, abfiltrieren und waschen. Dieser Zyklus läßt sich beliebig wiederholen.

Auf einen Träger kann ganz verzichtet werden, wenn man mehrere Bausteine gleichzeitig zum Endprodukt verknüpft (Bild 5). Die Zahl geeigneter Multikomponentenreaktionen ist jedoch beschränkt, und bisher sind nur wenige Strukturen damit zugänglich. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, als Startkomponente ein Molekül – zum Beispiel in Form eines Rings – mit mehreren Bindungsstellen zu verwenden. Diese tragen Schutzgruppen, die einzeln entfernt werden, wobei man jeweils gezielt einen bestimmten Baustein anfügen kann.

Träger entfallen natürlich auch bei der erwähnten biotechnologischen Produktion von Phagenbibliotheken. Dasselbe gilt für ein ähnliches Verfahren, mit dem sich kombinatorische Varianten einer bestimmten Klasse von Antibiotika erzeugen lassen. Diese sogenannten Makrolide, zu denen etwa das Erythromycin gehört, sind Ringe (genauer: Makrolactone, also innere Ester) aus zyklisch aneinander gereihten langkettigen Hydroxycarbonsäuren mit angehängten Zucker-

en. Durch Variation von Art und Reihenfolge der eingebauten Säuren erhält man unterschiedliche Vertreter. In der Natur sind für den Zusammenbau bakterielle Enzyme zuständig. Verschiedene Gene, die in Gruppen (Modulen) zusammengefaßt werden können, codieren die zum Aufbau der Makrolide nötigen Enzyme. Bei n Modulen für die Biosynthese von Makroliden mit p Säuren führt die Klonierung aller möglichen Modulkombinationen zu p^n verschiedenen Produkten. Es handelt sich dabei um eine Art künstliche Evolution im Zeitraffer.

Ändern dürfte sich auch die Art, in der Daten über die Aktivität von getesteten Verbindungen in Pharmafirmen gesammelt und ausgewertet werden. Aus Informationen darüber, wie stark sich die Mitglieder einer kombinatorischen Bibliothek aus Tausenden von Verbindungen jeweils an einen bestimmten Rezeptor binden, lassen sich Rückschlüsse auf Form und Größe dieses Zielmoleküls einschließlich seiner Ladungsverteilung ziehen, ohne daß seine genaue Struktur bekannt ist. Dies wiederum gibt gezielte Hinweise darauf, in welche Richtung die existierende Leitverbindung am geschicktesten zu verändern wäre oder mit welchem Ausgangsmaterial man eine neue kombinatorische Bibliothek aufbauen könnte.

Obwohl wir gemäß dem Generalthema dieses Heftes die Entdeckung neuer Arzneimittel in den Vordergrund gerückt haben, sei nicht verschwiegen, daß die kombinatorische Chemie mittlerweile auch auf anderen Gebieten erprobt wird. In der Materialforschung etwa erhofft man sich von ihr einen schnellen und kostengünstigen Zugang zu neuen Werkstoffen. So haben Peter W. Schultz und seine Kollegen an der Universität von Kalifornien in Berkeley eine kombinatorische Bibliothek von Metalloxidfilmen erzeugt und sie nach Supraleitern, Katalysatoren und magnetoresistiven Substanzen durchforstet. Dabei stießen sie auf eine neue Substanzfamilie der allgemeinen Formel $La_x(Ba, Sr, Ca)_yCoO_z$ mit hohem Magnetwiderstand. Andere Forschungsgruppen erzeugten durch kombinatorische Methoden Flüssigkristalle (für Flachbildschirme) und Ausgangsmaterialien für Dünnschichtbatterien.

Mancher mag bemängeln, diese Art Chemie setze zu sehr auf den blinden Zufall: Man vereinigt eine Serie von Bausteinen und hofft auf ein verwertbares Ergebnis. Daß der Zufall dabei über Wissen und wohldurchdachte Planung triumphiere, ist jedoch eine Fehleinschätzung. Eine gute Bibliothek entsteht nur bei gründlicher Vorbereitung und Planung. Welche Bausteine kombiniert

und wie die entstandenen Strukturen auf biologische Aktivität geprüft werden sollen, muß man sich vorher genauestens überlegen.

Die kombinatorische Chemie bietet die Möglichkeit, auf neue und interessante Art große Datenmengen zu sammeln, zu organisieren und zu analysieren. Mit dem Prinzip, aus einer Menge verwandter Verbindungen die wirksamsten Komponenten auszuwählen, hat sie der Wirkstoffsuche neue Impulse gegeben. Und was vom Immunsystem abgeschaut ist, kann vielleicht sogar einmal Substanzen liefern, die korrigierend eingreifen, wenn die Körperabwehr ihrerseits versagt.

Matthew J. Plunkett und Jonathan A. Ellman haben bis vor kurzem gemeinsam an der Universität von Kalifornien in Berkeley über Verfahren zur kombinatorischen Synthese von potentiellen Wirkstoffmolekülen gearbeitet.

Plunkett ging nach seiner Promotion vor einem Jahr zu der Firma Arris Pharmaceutical in San Francisco (Kalifornien), wo er sich auf das Erstellen kombinatorischer Bibliotheken für Zufallsscreening und Proteasehemmung spezialisierte. Ellman ist seit 1992 Professor in Berkeley. Er und seine Mitarbeiter beschäftigen sich mit der Entwicklung chemischer Verfahren, die sich speziell für die Synthese von Bibliotheken organischer Verbindungen eignen, sowie mit der Anwendung solcher Bibliotheken auf Fragestellungen in Chemie und Biologie.

remy Thorner in: *Nature*, Band 384, Nummer 6604, Seiten 14 bis 16; 7. November 1996.

Neue Reaktionen für die kombinatorische Chemie. Von Oliver Lack und Lutz Weber in: *Chimia*, Band 50, Heft 9, Seiten 445 bis 447; September 1996.

Combinatorial Chemistry. Sonderheft von: *Accounts of Chemical Research*. Herausgegeben von Anthony W. Czarnik und Jonathan A. Ellman, Band 29, Heft 3, März 1996.

Combinatorial Chemistry. Spezialteil in: *Chemical & Engineering News*, Band 74, Heft 7, Seiten 28 bis 73; 12. Februar 1996.

Synthesis and Application of Small Molecule Libraries. Von Lorin A. Thompson und Jonathan A. Ellman in: *Chemical Reviews*, Band 96, Heft 1, Seiten 555 bis 600; Januar 1996.

Kombinatorische Chemie – Revolution in der Pharmaforschung? Von L. Weber in: *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium*, Band 42, Seiten 698 bis 702 (1994).

Literaturhinweise

Ein Fortschritt in der Arzneistoffforschung: Rationales Wirkstoffdesign mit der Kombinatorischen Chemie. Von Ulf Pindur in: *Pharmazie in unserer Zeit*, Band 26, Heft 1, Seiten 24 bis 30 (1997).

High-Throughput Screening for Drug Discovery. Von James R. Broach und Je-

Virtuelle kombinatorische Chemie

Heute kann man kombinatorische Substanzbibliotheken auf dem Computer modellieren und die mutmaßlichen Eigenschaften ihrer Mitglieder rein rechnerisch grob abschätzen. Nur die Moleküle, die voraussichtlich die gewünschte pharmakologische Wirkung zeigen, brauchen dann tatsächlich synthetisiert zu werden.

Von Roger Lahana

Höchstes Ziel jedes Pharmalabors ist es, neuartige Wirkstoffe mit genau umschriebenen Eigenschaften zu kreieren. Die noch junge kombinatorische Chemie bietet dazu einen leistungsfähigen Ansatz (siehe den Beitrag auf Seite 28). Ihr Nutzen läßt sich aber noch steigern, wenn man sie mit der Analyse virtueller Moleküldatenbanken auf dem Computer verbindet:

Bevor man eine kombinatorische Substanzbibliothek im Labor synthetisiert, kann man für deren Mitglieder mit spezieller Software auf dem Rechner bereits die mutmaßliche Wirksamkeit ermitteln und braucht dann nur die vielversprechendsten Moleküle tatsächlich herzustellen; das spart viel Zeit und Aufwand.

Die Modellierung von Molekülen am Computer ist heute ein fest etabliertes

Verfahren in der Pharmaforschung. Im allgemeinen geht man dabei von der binären Repräsentation einer biologischen Zielstruktur (etwa einem Rezeptor) aus und konstruiert am Rechner einen optimal dazu passenden Liganden, indem man ein schon bekanntes Molekül abwandelt, das eine gewisse Affinität zur Zielstruktur zeigt, oder aus einem vorgegebenen Satz von Bestandteilen ein ganz

Neue Wirkstoffe durch kombinatorische Chemie

Verfahren, mit denen sich aus mehreren Sätzen von chemischen Bausteinen in kurzer Zeit sämtliche möglichen Kombinationen erzeugen lassen, liefern bei geschickter Wahl der Bausätze Myriaden potentieller Wirkstoffe, aus denen man mit Screening-Verfahren die aussichtsreichsten auslesen kann.

Von Matthew J. Plunkett und Jonathan A. Ellman

P.D. 1997
p. 28-35 = 8

Das Immunsystem bekämpft Infektionen unter anderem mit so genannten Antikörpern, die sich an die eingedrungenen Krankheitserreger heften. Etwa eine Billion verschiedener solcher Proteine kann der Körper herstellen, indem er einfach aus mehreren Sortimenten möglicher Bestandteile beliebige Kombinationen bildet. Statt für jeden neuen Krankheitserreger eigens einen speziellen Antikörper maßzuschneidern – was viel zu aufwendig wäre –, konfrontiert das Immunsystem den Ein- dringling mit der Armada der vorhandenen Versionen, wobei sich von alleine herausstellt, welche darunter die beste Paßform haben und sich somit am stärksten anheften.

Letztendlich führt das Immunsystem also ein Massenscreening seines Antikörpervorrats durch, um die am besten geeigneten Exemplare zu finden und diese dann gezielt in großen Mengen zu produzieren. Seit einigen Jahren eifern wir und Chemiker andernorts bei der Entwicklung neuer Arzneimittel diesem natürlichen Vorbild nach. Ähnlich wie das Immunsystem erzeugen wir durch systematisch variiertes Aneinanderfügen von Bausteinen eine große Anzahl verwandter Substanzen, die wir dann auf ihre therapeutische Wirksamkeit durchmustern.

Dieser kombinatorische Ansatz unterscheidet sich grundlegend von der traditionellen Suche nach neuen Wirkstoffen. Dabei prüfen Mitarbeiter von Pharmafirmen wahllos so ziemlich alle Substanzen, deren sie habhaft werden – synthetische Verbindungen ebenso wie Stoffe, die aus Bakterien, Pflanzen oder anderen natürlichen Quellen stammen –, auf Anzeichen pharmazeutischer Aktivität. Sobald sie auf eine erfolgversprechende Substanz (eine sogenannte Leitverbindung) stoßen, modifizieren sie diese Schritt für Schritt und testen jeweils, wie sich die Änderung auf die chemischen und biologischen Eigenschaften ausgewirkt hat.

Dieses Verfahren liefert in vielen Fällen zwar im Endergebnis einigermaßen wirksame Verbindungen mit tolerablen Nebenwirkungen. Doch der Aufwand ist enorm: Für jedes so entwickelte neue Arzneimittel, das auf den Markt kommt, wurden Tausende ähnlicher Verbindungen synthetisiert, erprobt und schließlich verworfen. Das kostet Zeit und Geld: Der Weg von einer Leitverbindung zum Präparat in der Apotheke zieht sich über Jahre hin und verschlingt Hunderte von Millionen Mark.

Zwar wurde das klassische Verfahren durch schnellere und zuverlässigere Screening-Tests verbessert: Außerdem hat man zunehmend gelernt, wie sich ein

Wirkstoff durch welche Modifikationen verändert lässt. Aber mit dem Fortschritt in der Medizin ist auch der Bedarf an Medikamenten gestiegen, die gezielt in Krankheitsprozesse eingreifen, wohingegen die Auswahl an noch nicht untersuchten potentiellen Wirkstoffen stetig schrumpft. Dabei sind moderne kalorimetrische Screeningverfahren, welche die Affinität eines potentiellen Wirkstoffs zu seiner Zielstruktur über die bei der Anlagerung freigesetzte Bindungsenergie messen, so leistungsfähig, daß man damit einige zehntausend Moleküle pro Monat durchtesten kann. Deshalb braucht die Forschung einerseits viel mehr Verbindungen für das Screening und andererseits ein Verfahren, das Leitverbindungen liefert, deren Optimierung nur noch wenige Feinabstimmungen erfordert.

Die kombinatorische Chemie kommt diesem Bedarf entgegen. Mit ihr lassen sich in kürzester Zeit mehrere Millionen strukturell verwandter Substanzen erzeugen. Und dies sind nicht etwa beliebige Moleküle, sondern ausgewählte Verbindungen, bei denen aufgrund der Eigenschaften der Ausgangsmaterialien zu erwarten ist, daß zumindest einige in mehr oder weniger ausgeprägter Form die gewünschte Aktivität zeigen. Durch Screening des resultierenden Verbindungs- pools kann man die wirksamsten Varian-

ten auslesen. Damit liefert die kom-
torische Chemie schneller und zu niedri-
geren Kosten als je zuvor aussichtsreiche
Kandidaten für die klinische Prüfung.

Die Suche nach der richtigen Kombination

Die Herstellung der Sammlungen („Bibliotheken“) von Substanzen für das Screening ist denkbar einfach: Mittels chemischer Standardreaktionen fügt man ausgewählte Bausteine zu vielen verschiedenen größeren Strukturen zusammen, indem man sie in unterschiedlicher Kombination der Reihe nach aneinanderhängt. Als abstraktes Beispiel betrachten wir vier Moleküle, die schematisch mit A1, A2, B1 und B2 benannt seien. Die Bezeichnungsweise drückt aus, daß die Moleküle des ersten und zweiten Paars jeweils strukturell miteinander verwandt sind und zur selben Verbindungsklasse gehören. Die beiden Klassen seien dabei so gewählt, daß ihre Mitglieder miteinander zu neuen Molekülen reagieren können, unter denen sich vielleicht auch ein wirksames Arzneimittel befindet. Das Prinzip der kombinatorischen Chemie besteht nun darin, einfach alle möglichen Kombinationen herzustellen – A1-B1, A1-B2, A2-B1 und A2-B2 – und auf Wirksamkeit zu überprüfen.

Natürlich wird im Ernstfall mit wesentlich mehr Bausteinen gearbeitet. So könnte man etwa 30 strukturell verwandte Verbindungen auswählen, die alle eine Aminogruppe ($-\text{NH}_2$) tragen, und dazu einen zweiten Satz von 30 Substanzen aussuchen, die sämtlich eine Carboxylgruppe ($-\text{COOH}$) enthalten. Unter geeigneten Bedingungen ließe sich jedes Amin mit jeder Carbonsäure unter Abspaltung von Wasser (H_2O) zu einem Amid ($-\text{CONH}-$) verknüpfen, was insgesamt 30×30 , also 900, verschiedene Kombinationen ergäbe. Nähme man ein drittes Sortiment von 30 Bausteinen hinzu, so betrüge die Gesamtzahl der Strukturen am Ende sogar 27 000 ($30 \times 30 \times 30$). Je mehr Sätze und Substanzen pro Satz, desto größer die Zahl der möglichen Kombinationen.

In der Praxis kann man zwischen zwei grundlegenden kombinatorischen Verfahren wählen. Das erste – die sogenannte Parallelsynthese – hat Mitte der achtziger Jahre H. Mario Geysen (jetzt bei der Firma Glaxo Wellcome) erfunden. Ursprünglich wollte er damit in kürzester Zeit herausbekommen, welcher kleine Abschnitt eines gewissen großen Proteins sich an einen Antikörper gebunden hatte. Dazu erzeugte er viele kurze Proteinstücke (Peptide), indem er mehrere

Aminosäuren (die Bausteine von Peptiden und Proteinen) in verschiedenen Permutationen zusammenfügte, wobei er Dutzende bis Hunderte von Reaktionen gleichzeitig durchführte. Dann prüfte er, welches der entstandenen Peptide sich an den Antikörper heftete; es mußte aus derselben Abfolge von Aminosäuren bestehen wie der gesuchte Proteinabschnitt.

Bei einer Parallelsynthese werden alle Produkte getrennt in ihrem eigenen Reaktionsgefäß zusammengefügt. Das geschieht oft auf einer Mikrotitrationsplatte: einer flachen Plasticscheibe mit typi-

schischen 8×12 kleinen Vertiefungen. In jeder Mulde befinden sich jeweils einige Milliliter der Flüssigkeit, in der die Reaktion stattfinden soll. Die Anordnung in Reihen und Spalten erleichtert das systematische Kombinieren der Bausteine und die Identifikation der Produkte.

Will man zum Beispiel mit der beschriebenen Reaktion eine Serie von Amiden herstellen, indem man acht Amine und zwölf Carbonsäuren kombiniert, so tropft man zweckmäßigerweise in die Vertiefungen der ersten Reihe eine Lösung mit dem ersten Amin, in die der

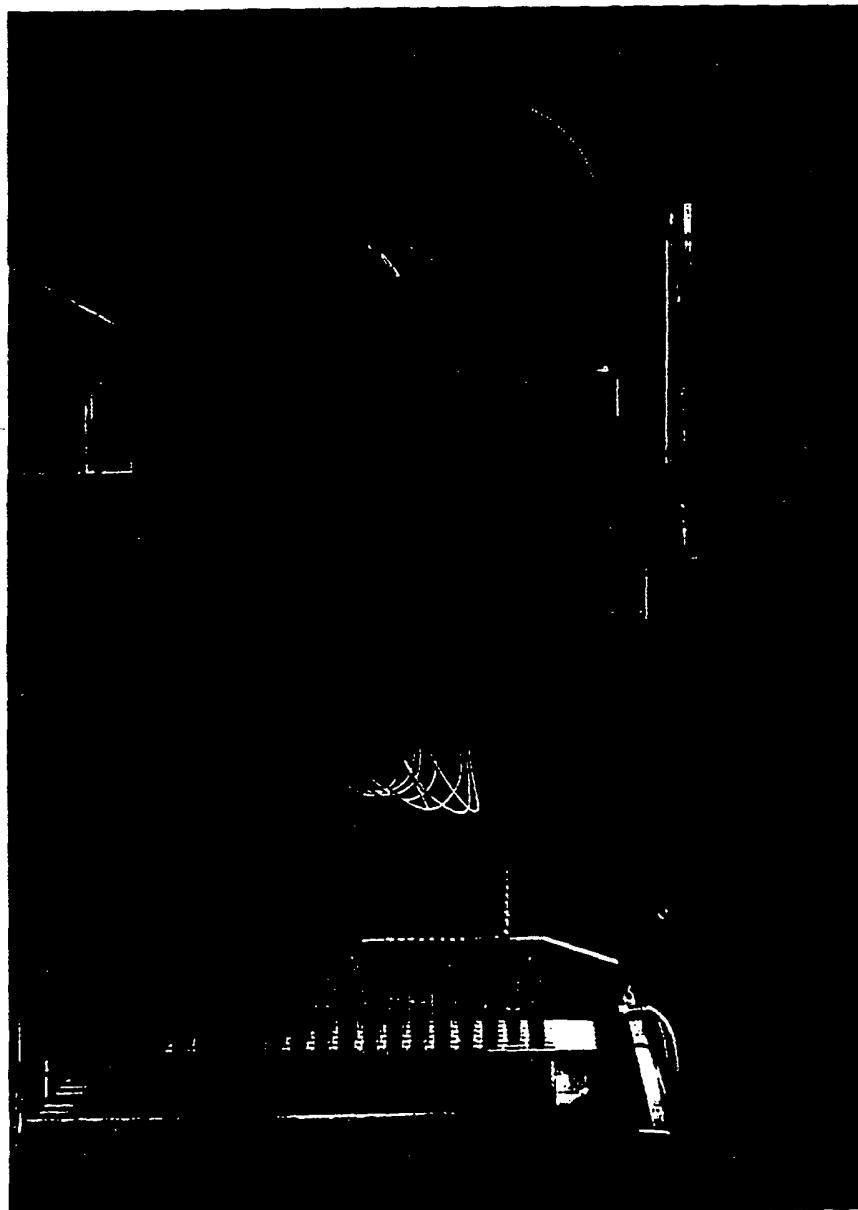


Bild 1: Ein Roboter tropft Chemikalien, die als Bausteine für die reihenweise Synthese von großen Mengen systematisch variiertem Verbindungen dienen, in die entsprechenden Reagenzgläser.

Die Automatisierung bewirkt, daß die kombinatorische Chemie noch schneller und präziser potentielle neue pharmakologisch Wirkstoffe liefert.

zweiten Reihe eine mit dem zweiten Amin, und so weiter. Danach gibt man in jede Spalte je eine Carbonsäure. Je einer der 96 entstehenden Verbindungen läßt sich dann leicht anhand ihres Reihen- und Spaltenindex identifizieren.

Häufig wird bei einer kombinatorischen Synthese der erste Bausteinsatz an inerte mikroskopische Polystyrolkugelchen (oft als fester Träger bezeichnet)

gebunden. Nach jeder Umsetzung kann man dann alles Material, das nicht reagiert hat, einfach abspülen, wobei allein die an den Kugeln haftenden erwünschten Produkte zurückbleiben. Der zusätzliche Aufwand, den das Anheften des ersten Bausteins und das spätere Ablösen des fertigen Moleküls bedeuten, wird durch die leichtere Reinigung der Zwischenprodukte mehr als aufgewogen.

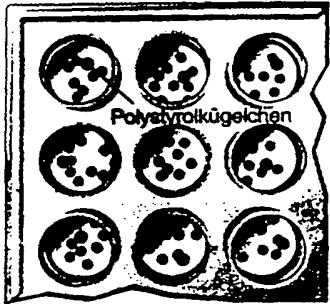
Heutzutage übernehmen Automaten die Routinearbeiten der Parallelsynthese wie das Einbringen kleiner Mengen reaktiver Substanzen in die Vertiefungen (Bild 1). Dies macht das Verfahren präziser und weniger mühselig. Bei dem Pharmaunternehmen Parke-Davis mit Hauptsitz in Morris Plains (New Jersey) wurde ein Roboter für die automatisierte Parallelsynthese konstruiert, der 40 Verbindungen auf einmal herstellen kann, und bei der Arzneimittelfirma Onogen in Carlsbad (Kalifornien) ist nun ein Automat in Betrieb, der bis zu 1000 Verbindungen am Tag zu synthetisieren vermag. Der Zeitbedarf für eine Parallelsynthese ist grob proportional zur Zahl der herzustellenden Verbindungen: Für doppelt so viele Substanzen braucht man fast doppelt so lange. Aus solch praktischen Gründen lassen sich auf diesem Wege nur Bibliotheken mit einigen 10 000 Verbindungen herstellen.

Eine elegante moderne Variante der Parallelsynthese arbeitet nach dem Vorbild der lithographischen Verfahren zur Herstellung von Computerchips mit einer gezielten Aktivierung durch selektives Belichten (Bild 4). Dabei werden die Moleküle des ersten Bausteinsatzes an bestimmte Stellen eines plattenförmigen Trägers fixiert. Sie tragen am freien Ende eine lichtempfindliche Schutzgruppe, die sie am Reagieren hindert. Durch gezieltes Belichten kann man diese Gruppen selektiv entfernen; an den exponierten Stellen verbindet sich, wenn man die Platte in eine Lösung mit einem zweiten Baustein taucht (der ebenfalls am einen Ende eine Schutzgruppe trägt), dieser (mit seinem freien Ende) mit den Molekülen des ersten Satzes. Auf diese Weise kann man an verschiedenen Stellen der Platte in beliebiger Reihenfolge weitere Bausteine anfügen. Die als lichtgesteuerte Synthese bezeichnete Methode wurde 1990 bei der Firma Affymax in Palo Alto (Kalifornien) entwickelt, deren Mitarbeiter damit auf einer Fläche von weniger als zwei Quadratzentimetern 65 536 verschiedene Peptide erzeugten.

Parallelsynthese

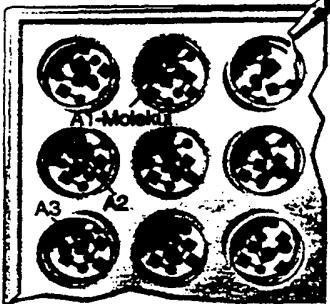
1. Schritt

In die – üblicherweise $8 + 12 = 96$ – Vertiefungen einer Mikrotitrationsplatte, von der hier nur die linke obere Ecke dargestellt ist, gibt man in einer Flüssigkeit dispergierte Polystyrolkugelchen (farbige Kreise).



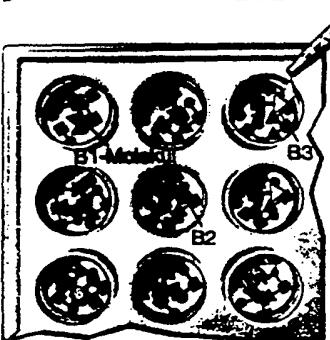
2. Schritt

Man fügt den ersten Satz an Molekülen – die A-Gruppe (Quadrate) – hinzu, indem man eine Lösung mit den A1-Molekülen in die Vertiefungen in der ersten Reihe, eine mit den A2-Molekülen in die Mulden der zweiten Reihe und so weiter tropft. Diese Moleküle enthalten eine Gruppierung, über die sie sich an die Oberfläche der Polystyrolkugeln heften. Anschließend wäscht man in jeder Vertiefung durch Zugabe von Lösungsmittel und Abfiltrieren nicht an die Kugeln gebundene überschüssige Reagentien aus.



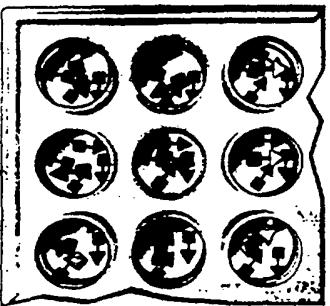
3. Schritt

Man fügt den zweiten Satz an Molekülen – die B-Gruppe (Dreiecke) – hinzu, indem man B1 in die Vertiefungen in der ersten Spalte, B2 in die der zweiten Spalte und so weiter tropft. Die B-Moleküle verbinden sich so in jeder möglichen Kombination mit den A-Molekülen, und jede Mulde enthält genau eine Kombination, die durch ihren Reihen-Spalten-Index festgelegt ist. Wieder werden am Ende überschüssige Reagentien ausgewaschen.



4. Schritt

Nach Herstellung der Bibliothek aus 96 verschiedenen AB-Kombinationen spaltet man die Moleküle von den Polystyrolkugeln ab. Sie können nun auf biologische Aktivität durchmusterst werden.



Teile und mische!

Das zweite Verfahren zum Erstellen einer kombinatorischen Substanzbibliothek arbeitet nach dem Prinzip „Teile und mische!“. Árpád Furka – inzwischen bei der Firma Advanced Chemtech in Louisville (Kentucky) – hat es in den späten achtziger Jahren entwickelt. Anders als bei der Parallelsynthese, wo jede Substanz für sich bleibt, wird dabei eine Mischung verwandter Verbindungen in ein und demselben Reaktionsgefäß er-

zeugt. Das verringert den apparativen Aufwand beträchtlich, und die Anzahl der Syntheseprodukte kann in die Millionen gehen. Dafür wird es jedoch sehr kompliziert, die Übersicht über die riesigen Mengen an Verbindungen zu behalten und die anschließenden Tests auf biologische Aktivität auszuwerten.

Betrachten wir als Beispiel eine Synthese mit drei Substanzklassen A, B und C und drei Stoffen pro Klasse. In diesem Falle fängt man mit drei Gefäßen an. Im ersten bindet man A1-Moleküle an Polystyrolkugeln, im zweiten A2- und im dritten A3-Moleküle; dabei wird jede Kugel jeweils mit bis zu 10 Billionen Molekülen derselben Sorte bestückt, so daß sie am Ende wie ein mit Stacheln gespickter Kaktus aussieht. Dann schüttet man alles in einen Topf, röhrt kräftig und verteilt das Substanzgemisch wiederum auf drei Gefäße, so daß jedes alle drei Verbindungen enthält. Nun werden in den ersten Behälter B1-, in den zweiten B2- und in den dritten B3-Moleküle gegeben. Nach Vereinigen, Mischen und erneutem Aufteilen fügt man in der nächsten Runde die C-Moleküle hinzu, was 27 verschiedene Verbindungen ergibt.

Diverse Pharmaunternehmen haben auch dieses Verfahren mittlerweile automatisiert. Die Firma Chiron Therapeutics in Emeryville (Kalifornien) war unter den ersten: Dort wurde ein Robotersystem entwickelt, mit dem sich Millionen von Verbindungen in einigen Wochen herstellen lassen. Der Automat setzt jeweils die benötigten Chemikalien zu und mischt und teilt die Kugelchen mit den Syntheseprodukten in jedem Schritt auf.

Um in dem Substanzgemisch am Ende die wirksamste Komponente zu identifizieren, testet man zuerst den Inhalt der Gefäße nach der letzten Umsetzung und ermittelt jeweils die mittlere Aktivität. Der nächste Schritt ist schwieriger: In dem Behälter mit dem wirksamsten Gemisch jene Baustein-Kombination zu identifizieren, welche die gewünschte biologische Aktivität hat. Doch auch dazu gibt es inzwischen eine Reihe von Verfahren.

Die meisten machen sich zunutze, daß alle Moleküle, die an einer einzelnen Kugel hängen, identisch sind. So fügt man bei einer Methode, die Kit S. Lam von der Universität von Arizona in Tempe entwickelt hat, zu dem Gemisch das mit einem Farbstoff markierte Zielmolekül, und kann dann leicht optisch erkennen, mit welchen Kugeln es sich verbindet (Bild 3). Diese sortiert man mit Mikropinzetten aus, löst die daran gebundenen Substanzen ab und bestimmt mit chemischen Analyseverfahren ihre Zusammensetzung. Leider funktioniert das Verfah-

ren nur für gewisse Verbindungen wie Peptide und kurze DNA-Moleküle (DNA ist die internationale Kurzbezeichnung für die Erbsubstanz Desoxyribonucleinsäure).

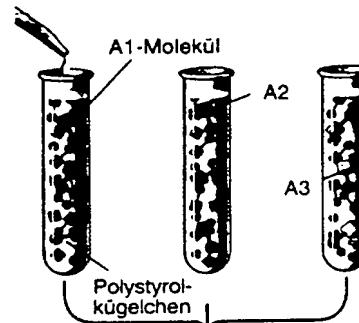
Andere Forschungsgruppen haben Methoden entwickelt, jeder Kugel ein leicht lesbares Etikett zu verpassen, das die Reihenfolge der Untereinheiten festhält, aus denen die anhängenden Mole-

külen aufgebaut wurden – sozusagen ein eigener Strichcode, der sich mit jedem neu angefügten Baustein um eine Markierung verlängert. Am Ende braucht man nur die Striche der Reihe nach abzulesen, um den Aufbau der Verbindungen auf der jeweiligen Kugel zu ermitteln. Wissenschaftler bei der Biotechnologiefirma Pharmacopeia in Princeton (New Jersey) konnten mit effizienten Etikettie-

Synthese nach dem Prinzip „Teile und Mische“

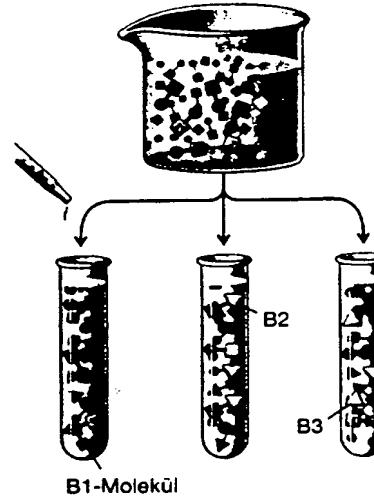
1. Schritt

Man verteilt den ersten Satz an Bausteinen – die A-Gruppe (Quadrat) – auf verschiedene Reagenzgläser, die jeweils Dispersionen von Polystyrolkugeln (farbige Kreise) in einer Flüssigkeit enthalten. Normalerweise umfaßt ein solcher Satz Dutzende von Verbindungen; der Einfachheit halber sind es hier jedoch nur drei. Die A-Moleküle heften sich – und zwar mehrere auf einmal (anders als hier gezeigt) – an die Oberfläche der Polystyrolkugeln. In Lösung gebliebene überschüssige Reagentien werden ausgewaschen.



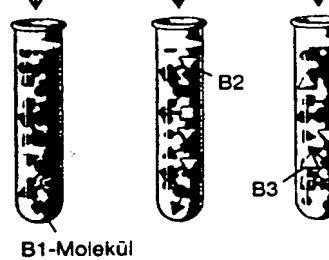
2. Schritt

Der Inhalt aller Reagenzgläser wird zusammengeschüttet.



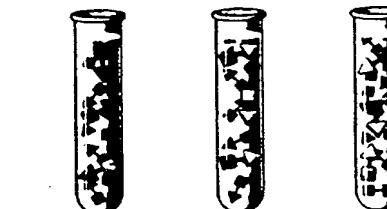
3. Schritt

Das Gemisch wird wiederum auf mehrere Reagenzgläser aufgeteilt. Nun fügt man den zweiten Satz an Molekülen – die B-Gruppe (Dreiecke) – hinzu, indem man B1 in das erste Reagenzglas tropft, B2 in das zweite und so weiter. Es folgt das übliche Auswaschen. Schritte 2 und 3 können je nach Anzahl der anzuwendenden Molekulsätze mehrfach wiederholt werden.



4. Schritt

Die Produktmoleküle werden von den Polystyrolkugeln abgespalten. Jedes Reagenzglas enthält nun eine Mischung aus verschiedenen Baustein-Kombinationen, die sich nicht ohne weiteres identifizieren lassen. Oft prüft man zunächst den gesamten Inhalt jedes Reagenzglases auf seine mittlere biologische Aktivität. Da alle Moleküle in einem Gefäß die zuletzt hinzugefügten Komponenten gemeinsam haben (entweder B1, B2 oder B3 in unserem Beispiel), erfährt man so, welche davon die wirksame Verbindung ergibt. Angenommen, es sei B2, kann man dann die Synthese wiederholen, indem man die A-Moleküle nun in getrennten Behältern nur mit B2 reagieren läßt und die Produkte einer weiteren Prüfung



unterzieht. Eine Alternative ist, die Polystyrolkugeln mitsamt den angeknüpften Produkten zu testen und diejenigen auslesen, welche die gewünschte Aktivität zeigen. Erst danach spaltet man von diesen die (identischen) Moleküle ab und analysiert sie auf ihre Zusammensetzung.

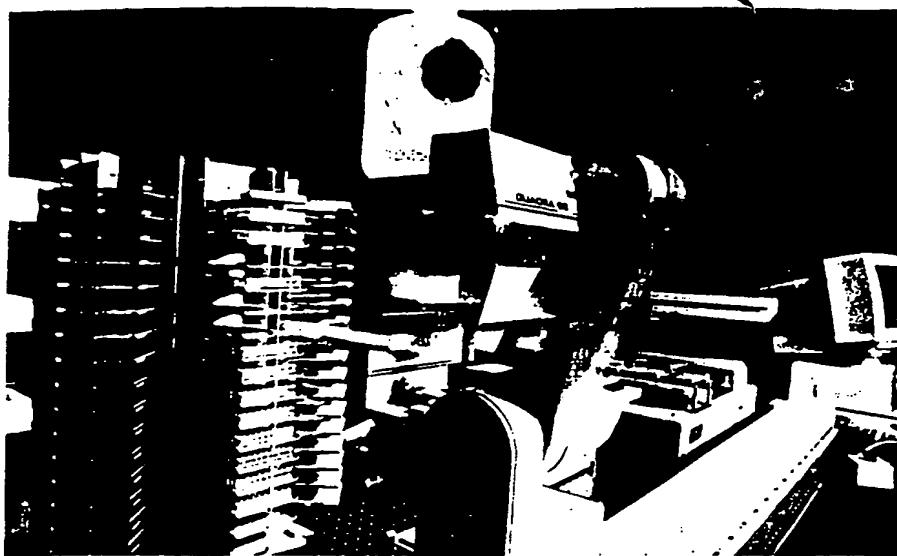


Bild 2: Auch das Durchmustern kombinatorischer Substanzbibliotheken nach Stoffen mit erwünschter biologischer Akti-

vität ist automatisierbar. Hier befördert ein Screening-Roboter Mikrotitrationsplatten mit Reaktionsprodukten zum Prüfgerät.

lungstechniken, zu denen W. Clark Still von der Columbia-Universität in New York die Grundideen beigesteuert hatte, sehr zuverlässig eigene kombinatorische Substanzbibliotheken auswerten. Wegen der immer noch bestehenden Schwierigkeiten bei der Identifikation von Verbindungen aus einer Teile-und-Mische-Synthese bevorzugen die meisten Pharmaunternehmen jedoch weiterhin das Parallelverfahren.

Das Erstellen von Wirkstoffbibliotheken

Beide Grundmethoden der kombinatorischen Chemie dienten ursprünglich zur Herstellung von Peptiden. Das hatte einen rein praktischen Grund: Das An-einanderhängen von Aminosäurebausteinen an einem festen Träger ist eine biochemische Elementarreaktion, die schon seit den sechziger Jahren perfektioniert

worden war. Mit geeigneten Reagentien und unter den richtigen Bedingungen erfordert es nur einfaches Mischen und Rühren und läuft praktisch mit 100prozentiger Ausbeute ab. Dadurch lassen sich mehrstufige Synthesen auf festem Träger völlig ohne Reinigung der Zwischenprodukte durchführen; oft können sogar die Endprodukte ungereinigt zum Screening gehen.

Große kombinatorische Peptidbibliotheken lassen sich außerdem auf relativ einfache Weise mit gentechnischen Methoden gewinnen. Dazu führt man beispielsweise in das Gen für das Oberflächenprotein eines Phagen – eines Virus, das Bakterien befallt – ein kurzes DNA-Stück (Oligonucleotid) ein, das für ein bestimmtes Peptid codiert. Daraufhin produziert dieser Phage und seine gesamte Nachkommenschaft das entsprechende Peptid und präsentiert es an seiner Oberfläche. Durch systematische Variation der eingeführten DNA-Stücke konnte man so schon 1990 Bibliotheken mit 10 bis 100 Millionen Peptiden erzeugen, von denen viele eine bemerkenswerte Affinität zu diversen Rezeptoren zeigten – also zu Strukturen, an denen sich im Organismus Hormone, Neurotransmitter oder andere Botenstoffe anlagern und dadurch ihre jeweilige Wirkung ausüben.

Allerdings taugen Peptide, obwohl sie in biologischen Systemen eine sehr wichtige Rolle spielen, kaum als Arzneimittel; denn sie werden nur schlecht durch die Magenwand resorbiert, im Darm gespalten und selbst beim Injizieren schnell wieder aus dem Blutstrom entfernt. Um ihre Beständigkeit gegenüber Spaltenzymen (Proteasen) zu erhöhen, ist man deshalb auf künstliche Aminosäuren als Bausteine ausgewichen. Dennoch begann sich die Pharmaindustrie erst verstärkt für die kombinatorische Chemie zu interessieren, als abzusehen war, daß damit auch nicht-peptidische Wirkstoffe – etwa aus der Klasse der Benzodiazepine – zugänglich sind.

Benzodiazepine gehören zu den meistverschriebenen Arzneimitteln und dienen – wie der bekannteste Vertreter Diazepam (Valium) – hauptsächlich als Tranquillizer zur Stimmungsaufhellung, zum Lösen von Angst-, Spannungs- und Unruhezuständen sowie als Schlafmittel. Das Spektrum umfaßt aber auch eine Reihe von Derivaten mit weiteren therapeutischen Wirkungen. Dazu zählen krampflösende und schlafverhindernde Mittel. Gegenspieler des blutplättchenaktivierenden Faktors (der bei der Blutgerinnung eine bedeutende Rolle spielt), Hemmstoffe für das Enzym Reverse Transkriptase des AIDS-Erregers HIV

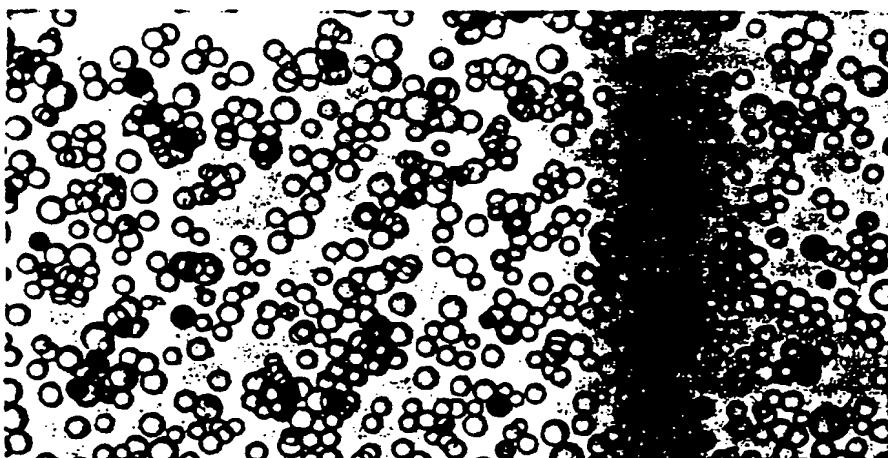


Bild 3: Die Startmoleküle einer kombinatorischen Synthese heftet man oft an Polystyrolkugeln und fügt schrittweise die weiteren Bausteine an. Dadurch lassen sich die am festen Träger haftenden Produkte leicht von den gelösten überschüssigen Reagentien trennen. Außerdem kann man auf diese Weise unterschiedliche Baustein-Kombinationen im gleichen Reaktionsgefäß synthetisieren, was das Verfahren vereinfacht. An ein und demselben Kugelchen haften stets

identische Produkte, die sich bei Durchmustern auf Wirksamkeit prüfen lassen. An den rot erscheinenden Partikeln auf dieser etwa 100fach vergrößerten Mikrophotographie hängen zum Beispiel Moleküle, an die sich bei einem Reihentest künstliche (mit einem roten Farbstoff markierte) Steroidrezeptoren angelagert haben. Man kann die betreffenden Kugelchen aussortieren und die Zusammensetzung der anhaftenden Moleküle analytisch bestimmen.

(Human-Immunschwäche-Virus)

Inhibitoren des Enzyms Ras-Farnesytransferase, das an der Entstehung bestimmter Krebsarten beteiligt ist.

Wegen ihrer weitgefächerten biologischen Aktivität waren die Benzodiazepine auch die erste Verbindungsklasse, bei der man mittels kombinatorischer Chemie nach neuen therapeutisch nutzbaren Vertretern suchte. Im Jahre 1992 beschrieb einer von uns (Ellman) zusammen mit Barry Bunin (ebenfalls an der Universität von Kalifornien in Berkeley) eine Methode zu ihrer Synthese auf festen Trägern: das Verfahren ermöglichte die Erstellung von Bibliotheken mit mehreren tausend Derivaten.

Kürzlich entwickelten wir eine verbesserte Synthesemethode, die einen einfachen Zugang zu einer noch viel größeren Zahl von Benzodiazepinen bietet. Die anspruchsvollste Aufgabe beim Entwurf einer kombinatorischen Synthesemethode ist, jene Reaktionsbedingungen zu ermitteln, bei denen sich möglichst wenig störende Nebenprodukte bilden. Diese Feinabstimmung zum Vermeiden von Verunreinigungen beschäftigte uns über ein Jahr; als wir schließlich das optimale Verfahren gefunden hatten, vermochten wir in nur zwei Monaten zusammen mit Bunin in einer Parallelsynthese 11 200 Verbindungen herzustellen.

In den verschiedenen Benzodiazepin-Bibliotheken konnten wir mehrere Substanzen mit interessanten biologischen Wirkungen identifizieren. So fanden wir in Zusammenarbeit mit Victor Levine und Raymond Budde vom M.-D.-Anderson-Krebszentrum in Houston (Texas) einen Hemmstoff für ein Enzym, das bei Dickdarmkrebs und Osteoporose eine Rolle spielt. Ein anderes Benzodiazepin, das wir gemeinsam mit Gary Glick und seinen Kollegen an der Universität von Michigan in Ann Arbor entdeckten, blockiert die Bindung von Antikörpern an einzelsträngige DNA, die beim systemischen Lupus erythematoses auftritt, einer türkischen Autoimmunerkrankung, die zur Gefäßentzündung führt und viele Organe schädigen kann. Beide Substanzen befinden sich aber noch in der ersten Testphase im Labor.

Nachdem so erwiesen war, daß sich mittels kombinatorischer Chemie auch nicht-peptidische Wirkstoffe herstellen lassen, begann sich die Pharmaindustrie auf diesem Gebiet zu engagieren. In den letzten fünf Jahren entstanden Dutzende kleiner Firmen, die sich ausschließlich mit dieser Art der Wirkstoffsuche beschäftigen, und fast alle größeren Pharmaunternehmen haben inzwischen eigene Abteilungen für kombinatorische Chemie oder arbeiten mit einem klei-

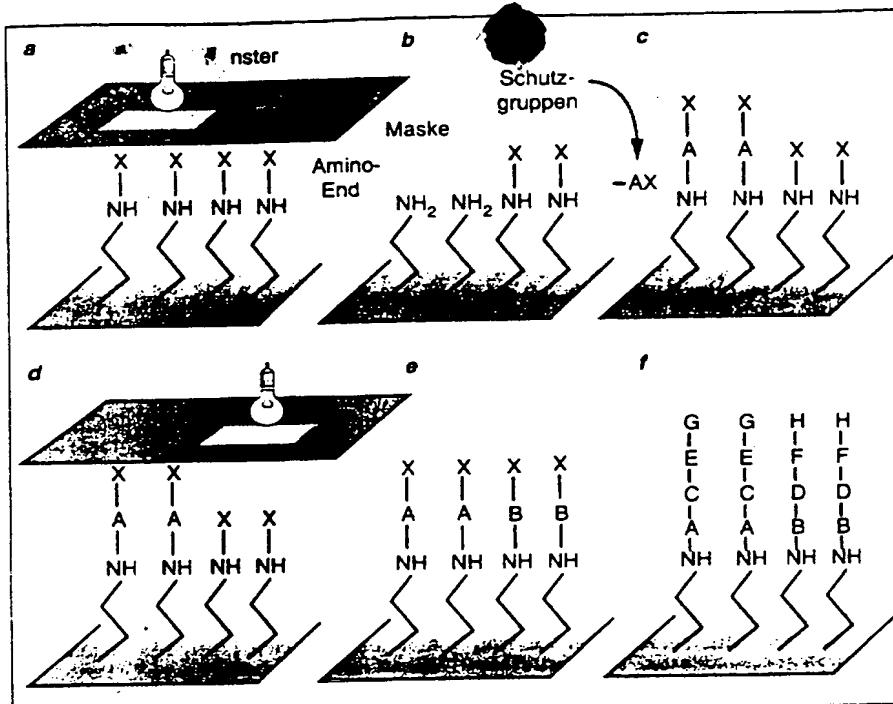


Bild 4: Die lichtgesteuerte Synthese ist ein elegantes neueres Verfahren zur Herstellung kombinatorischer Peptidbibliotheken, das sich an die in der Halbleiterindustrie gebräuchlichen lithographischen Methoden anlehnt. Dabei verwendet man Aminosäurebausteine, die an ihrem Amino-Ende mit einer lichtempfindlichen Schutzgruppe (X) versehen sind, und bindet die Moleküle des ersten Satzes über das Carboxyl-Ende an einen flachen Feststoffträger (a). Diesen deckt man mit einer Maske ab, die nur ein kleines Areal freiläßt, und entfernt dort

durch Belichten die Schutzgruppe (b). Beim Eintauchen des Trägers in eine Lösung mit einem weiteren geschützten Aminosäurebaustein (A-X), vermag dieser ausschließlich mit den freien Amino-Enden zu reagieren (c). Anschließend kann man die Maske verschieben, eine neue Stelle belichten (d) und dort eine andere Aminosäure (B) ankoppeln (e). Nach diesem Prinzip lassen sich dicht nebeneinander auf der Trägerplatte verschiedene Peptide aufbauen, deren Zusammensetzung und Position von einem Computer gespeichert werden (f).

neren, darauf spezialisierten Partner zusammen.

Die Benzodiazepine waren nur der Anfang. Mittlerweile wird kombinatorische Chemie mit einer breiten Palette von Ausgangsmaterialien betrieben. Meist verwendet man dabei kombinatorische Bibliotheken aus kleinen organischen Molekülen als Fundgruben aussichtsreicher Leitverbindungen oder zur Optimierung eines schon bekannten Wirkstoffs. Im ersten Falle werden oft große Sammlungen mit Zehntausenden oder gar Millionen von Substanzen erzeugt. Dagegen enthält eine Bibliothek, mit der die Wirksamkeit und Verträglichkeit einer existierenden Leitverbindung gesteigert werden soll, üblicherweise nur einige hundert Verbindungen.

Inzwischen haben es Wirkstoffe, die der kombinatorischen Chemie entstammen, auch schon bis zu klinischen Tests am Menschen gebracht. Wegen der Neuheit des Verfahrens konnte zwar noch keiner lange genug untersucht werden, um von der amerikanischen Gesundheitsbehörde (U.S. Food and Drug Ad-

ministration) die Zulassung zu erhalten; doch ist es nur noch eine Frage der Zeit, bis das erste solche Medikament auf den Markt kommt.

In einem weit fortgeschrittenen Entwicklungsstadium befindet sich zum Beispiel ein potentielles Arzneimittel bei dem internationalen Pharmakonzern Pfizer mit Hauptsitz in New York. Dort war 1993 mit Standardmethoden eine Leitverbindung mit einer gewissen vorbeugenden Wirkung gegen Atherosklerose („Arterienverkalkung“) entdeckt worden. Mittels Parallelsynthese konnten in einem firmeneigenen Laboratorium mehr als 1000 Derivate hergestellt werden, von denen einige 100mal wirksamer als die Leitverbindung waren. Ein daraus abgeleiteter Wirkstoff wird nun klinisch getestet. Hier zeigt sich der immense Vorteil des kombinatorischen Ansatzes: Über 1000 Substanzen auf konventionelle Art der Reihe nach herzustellen, um einige wenige mit erhöhter biologischer Aktivität zu finden, hätte einen Aufwand an Zeit und Geld bedeutet, den sich nur wenige Laboratorien leisten könnten.

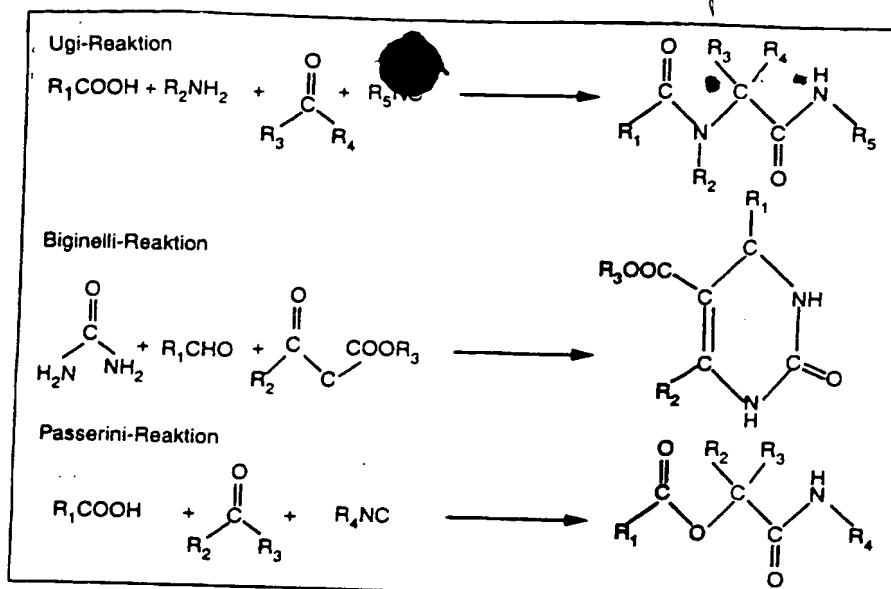


Bild 5: Die kombinatorische Synthese von Molekülen, deren Bausteine über schwer zu knüpfende Kohlenstoff-Kohlenstoffbindungen miteinander verbunden sind, ist eine Herausforderung an die Chemiker. Bislang gibt es erst wenige Reaktionen, die

sich dafür eignen. Dazu gehören die drei hier aufgeführten. Durch systematische Variation der Substituenten R_i kann man damit aus Carbonsäuren, Aminen, Isonitrilen und Ketonen eine umfangreiche kombinatorische Substanzbibliothek aufbauen.

Bei Eli Lilly, einem multinationalen Pharmakonzern mit Sitz in Indianapolis (Indiana), wurde ebenfalls mit einer Parallelsynthese ein Mittel gegen Migräne entwickelt, das jetzt in der klinischen Prüfung ist. Die zunächst aufgefundene Leitverbindung heftet sich zwar sehr stark an die gewünschte Zielstruktur, hat aber zugleich eine hohe Affinität gegenüber anderen Rezeptoren, was unerwünschte Nebenwirkungen verursacht. In einer Parallelsynthese wurden etwa 500 Derivate erzeugt: darunter war jene währerischere Substanz, die jetzt getestet wird.

Perspektiven

Sicherlich werden sich Wege finden, kombinatorische Bibliotheken noch schneller und billiger zu erzeugen. Ein schon jetzt intensiv verfolgter Ansatz ist, mit ausgeklügelten Reaktionsverfahren die Ausbeute am jeweils erwünschten Endprodukt zu erhöhen. Andere Bestrebungen gehen dahin, die Polystyrolkügelchen entbehrlich zu machen. Zum einen bedeutet das Anheften des ersten Bausteins und das Ablösen des Endprodukts einen zusätzlichen Arbeitsaufwand. Vor allem aber haben feste Träger den Nachteil, daß der Zugang der Reagentien aus der Lösung zu den angebundenen Molekülen erschwert ist, was die Ausbeuten verringern kann. Dies läßt sich vermeiden, indem man statt Polystyrolkügelchen beispielsweise Polyethylenglykol

zum Anheften der zu synthetisierenden Moleküle verwendet. Es ist in Wasser und den meisten anderen gebräuchlichen Lösungsmitteln gut, in Ether dagegen kaum löslich. Man kann somit das Anhängen eines neuen Bausteins in Lösung durchführen und danach durch Zugabe von Ether das Polyethylenglykol mit dem daran befestigten Zwischenprodukt ausfällen, abfiltrieren und waschen. Dieser Zyklus läßt sich beliebig wiederholen.

Auf einen Träger kann ganz verzichtet werden, wenn man mehrere Bausteine gleichzeitig zum Endprodukt verknüpft (Bild 5). Die Zahl geeigneter Multikomponentenreaktionen ist jedoch beschränkt, und bisher sind nur wenige Strukturen damit zugänglich. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, als Startkomponente ein Molekül – zum Beispiel in Form eines Rings – mit mehreren Anbindungsstellen zu verwenden. Diese tragen Schutzgruppen, die einzeln entfernt werden, wobei man jeweils gezielt einen bestimmten Baustein anfügen kann.

Träger entfallen natürlich auch bei der erwähnten biotechnologischen Produktion von Phagenbibliotheken. Dasselbe gilt für ein ähnliches Verfahren, mit dem sich kombinatorische Varianten einer bestimmten Klasse von Antibiotika erzeugen lassen. Diese sogenannten Makrolide, zu denen etwa das Erythromycin gehört, sind Ringe (genauer: Makrolactone, also innere Ester) aus zyklisch aneinander gereihten langkettigen Hydroxycarbonsäuren mit angehängten Zucker-

steinen. Durch Variation von Art und Reihenfolge der eingebauten Säuren erhält man unterschiedliche Vertreter. In der Natur sind für den Zusammenbau bakterielle Enzyme zuständig. Verschiedene Gene, die in Gruppen (Modulen) zusammengefaßt werden können, codieren die zum Aufbau der Makrolide nötigen Enzyme. Bei n Modulen für die Biosynthese von Makroliden mit p Säuren führt die Klonierung aller möglichen Modulkombinationen zu p^n verschiedenen Produkten. Es handelt sich dabei um eine Art künstliche Evolution im Zeitraffer.

Ändern dürfte sich auch die Art, in der Daten über die Aktivität von getesteten Verbindungen in Pharmafirmen gesammelt und ausgewertet werden. Aus Informationen darüber, wie stark sich die Mitglieder einer kombinatorischen Bibliothek aus Tausenden von Verbindungen jeweils an einen bestimmten Rezeptor binden, lassen sich Rückschlüsse auf Form und Größe dieses Zielmoleküls einschließlich seiner Ladungsverteilung ziehen, ohne daß seine genaue Struktur bekannt ist. Dies wiederum gibt gezielte Hinweise darauf, in welche Richtung die existierende Leitverbindung am geschicktesten zu verändern wäre oder mit welchem Ausgangsmaterial man eine neue kombinatorische Bibliothek aufbauen könnte.

Obwohl wir gemäß dem Generalthema dieses Heftes die Entdeckung neuer Arzneimittel in den Vordergrund gerückt haben, sei nicht verschwiegen, daß die kombinatorische Chemie mittlerweile auch auf anderen Gebieten erprobt wird. In der Materialforschung etwa erhofft man sich von ihr einen schnellen und kostengünstigen Zugang zu neuen Werkstoffen. So haben Peter W. Schultz und seine Kollegen an der Universität von Kalifornien in Berkeley eine kombinatorische Bibliothek von Metalloxidfilmen erzeugt und sie nach Supraleitern, Katalysatoren und magnetoresistiven Substanzen durchforstet. Dabei stießen sie auf eine neue Substanzfamilie der allgemeinen Formel $La_x(Ba, Sr, Ca)_y CoO_z$ mit hohem Magnetwiderstand. Andere Forschungsgruppen erzeugten durch kombinatorische Methoden Flüssigkristalle (für Flachbildschirme) und Ausgangsmaterialien für Dünnschichtbatterien.

Mancher mag bemängeln, diese Art Chemie setze zu sehr auf den blinden Zufall: Man vereinigt eine Serie von Bausteinen und hofft auf ein verwertbares Ergebnis. Daß der Zufall dabei über Wissen und wohlgedachte Planung triumphiere, ist jedoch eine Fehleinschätzung. Eine gute Bibliothek entsteht nur bei gründlicher Vorbereitung und Planung. Welche Bausteine kombiniert

und wie die entstandenen Strukturen auf biologische Aktivität geprüft werden sollen, muß man sich vorher genauestens überlegen.

Die kombinatorische Chemie bietet die Möglichkeit, auf neue und interessante Art große Datenmengen zu sammeln, zu organisieren und zu analysieren. Mit dem Prinzip, aus einer Menge verwandter Verbindungen die wirksamsten Komponenten auszuwählen, hat sie der Wirkstoffsuche neue Impulse gegeben. Und was vom Immunsystem abgeschaut ist, kann vielleicht sogar einmal Substanzen liefern, die korrigierend eingreifen, wenn die Körperabwehr ihrerseits versagt.

Matthew J. Plunkett und Jonathan A. Ellman haben bis vor kurzem gemeinsam an der Universität von Kalifornien in Berkeley über Verfahren zur kombinatorischen Synthese von potentiellen Wirkstoffmolekülen gearbeitet.

Plunkett ging nach einer Promotion vor einem Jahr zu der Firma Arris Pharmaceutical in San Francisco (Kalifornien), wo er sich auf das Erstellen kombinatorischer Bibliotheken für Zufallsscreening und Proteasehemmung spezialisierte. Ellman ist seit 1992 Professor in Berkeley. Er und seine Mitarbeiter beschäftigen sich mit der Entwicklung chemischer Verfahren, die sich speziell für die Synthese von Bibliotheken organischer Verbindungen eignen, sowie mit der Anwendung solcher Bibliotheken auf Fragestellungen in Chemie und Biologie.

Thorner in: *Nature*, Band 384, Nummer 6604, Seiten 14 bis 16; 7. November 1993.

Neue Reaktionen für die kombinatorische Chemie. Von Oliver Lack und Lutz Weber in: *Chimia*, Band 50, Heft 9, Seiten 445 bis 447; September 1996.

Combinatorial Chemistry. Sonderheft von: *Accounts of Chemical Research*. Herausgegeben von Anthony W. Czarnik und Jonathan A. Ellman, Band 29, Heft 3, März 1996.

Combinatorial Chemistry. Spezialteil in: *Chemical & Engineering News*, Band 74, Heft 7, Seiten 28 bis 73; 12. Februar 1996.

Synthesis and Application of Small Molecule Libraries. Von Lorin A. Thompson und Jonathan A. Ellman in: *Chemical Reviews*, Band 96, Heft 1, Seiten 555 bis 600; Januar 1996.

Kombinatorische Chemie – Revolution in der Pharmaforschung? Von L. Weber in: *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium*, Band 42, Seiten 698 bis 702 (1994).

Literaturhinweise

Ein Fortschritt in der Arzneistoffforschung: Rationales Wirkstoffdesign mit der Kombinatorischen Chemie. Von Ulf Pindur in: *Pharmazie in unserer Zeit*, Band 26, Heft 1, Seiten 24 bis 30 (1997).

High-Throughput Screening for Drug Discovery. Von James R. Broach und Je-

Virtuelle kombinatorische Chemie

Heute kann man kombinatorische Substanzbibliotheken auf dem Computer modellieren und die mutmaßlichen Eigenschaften ihrer Mitglieder rein rechnerisch grob abschätzen. Nur die Moleküle, die voraussichtlich die gewünschte pharmakologische Wirkung zeigen, brauchen dann tatsächlich synthetisiert zu werden.

Von Roger Lahana

Höchstes Ziel jedes Pharmalabors ist es, neuartige Wirkstoffe mit genau umschriebenen Eigenschaften zu kreieren. Die noch junge kombinatorische Chemie bietet dazu einen leistungsfähigen Ansatz (siehe den Beitrag auf Seite 28). Ihr Nutzen läßt sich aber noch steigern, wenn man sie mit der Analyse virtueller Moleküldatenbanken auf dem Computer verbindet:

Bevor man eine kombinatorische Substanzbibliothek im Labor synthetisiert, kann man für deren Mitglieder mit spezieller Software auf dem Rechner bereits die mutmaßliche Wirksamkeit ermitteln und braucht dann nur die vielversprechendsten Moleküle tatsächlich herzustellen; das spart viel Zeit und Aufwand.

Die Modellierung von Molekülen am Computer ist heute ein fest etabliertes

Verfahren in der Pharmaforschung. Im allgemeinen geht man dabei von der binären Repräsentation einer biologischen Zielstruktur (etwa einem Rezeptor) aus und konstruiert am Rechner einen optimal dazu passenden Liganden, indem man ein schon bekanntes Molekül abwandelt, das eine gewisse Affinität zur Zielstruktur zeigt, oder aus einem vorgegebenen Satz von Bestandteilen ein ganz